FLÁVIA CALÓ DE AQUINO XAVIER

EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DE GENES LOCALIZADOS NO CROMOSSOMO 11q EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA E SUA RELAÇÃO COM CRITÉRIOS DE AGRESSIVIDADE

São Paulo
2009

Flávia Caló de Aquino Xavier

Expressão de transcritos de genes localizados no cromossomo 11q em carcinoma epidermóide de boca e sua relação com critérios de agressividade

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

São Paulo

2009

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Xavier, Flávia Caló de Aquino
Expressão de transcritos de genes localizados no cromossomo 11q em carcinoma epidermóide de boca e sua relação com critérios de agressividade / Flávia Caló de Aquino Xavier; orientador Fabio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2009.
115p. : fig., tab.; 30 cm.

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

1. Carcinoma de células escamosas – Expressão gênica – Critérios de agressividade 2. Patologia Bucal

CDD 617.63
BLACK D61

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Xavier FCA. Expressão de transcritos de genes localizados no cromossomo 11q em carcinoma epidermóide de boca e sua relação com critérios de agressividade [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, __/__/___.

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À **Deus**, eternamente, pelo dom da vida, pela proteção e bênçãos alcançadas.

Ao meu marido **Júnior**, amor sólido e incondicional, por todo apoio, cumplicidade e companheirismo, fundamentais em todas as etapas desta caminhada.

Aos meus amados pais, **Clóvis** e **Gilzélia**, alicerces da minha vida, que mesmo diante da saudade, sempre me incentivaram e apoiaram as minhas escolhas. Aos meus queridos irmãos **Juliano**, pelo seu carinho e admiração**,** e **Clóvis Neto (*in memorian*)** pelo amor eterno.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes,** agradeço primeiramente a receptividade e oportunidade de ingressar na Disciplina de Patologia Bucal, além do apoio prestado em momentos importantes. Agradeço ainda a confiança sempre depositada e o incentivo constante para o meu aprimoramento em pesquisa, o que me permitiu a superação de obstáculos. Sua postura de mestre e exímio pesquisador serão sempre fontes valiosas de inspiração para meu crescimento profissional.

Às professoras titulares **Profa Dra Suzana C. Orsini Machado de Sousa,** a quem tenho profunda admiração pela delicadeza, competência e incrível ser humano que é, e **Profa Dra Marina Helena C. G. de Magalhães,** pela generosidade e oportunidades concedidas durante a Pós-Graduação, além de serem grandes exemplos de perseverança e dedicação.

Ao **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior**, agradeço pelos ensinamentos em Patologia Celular e pelo exemplo profissional, além de toda sua confiança, atenção e agradável convivência. A **Profa Dra Andréa Mantesso** pelo incentivo e por acreditar no meu potencial. Aos demais professores da disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, **Profa Dra Marília Trierveiler Martins e Profa Dra Karen Lopes Ortega** pelo convívio harmonioso, disponibilidade e valiosos ensinamentos transmitidos, fundamentais para a minha formação.

À minha querida **Profa Dra Luciana Maria Pedreira Ramalho,** do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Foi através de sua orientação segura desde a iniciação científica e mestrado, que sedimentou em mim o amor à pesquisa. Agradeço pelo seu apoio, fundamental para esta conquista, além da amizade sincera, confiança e por todo estímulo e suporte sempre prestados. Ao **Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos**, desta mesma instituição, pelo incentivo e apoio no ingresso do curso

À pesquisadora **Dra Patrícia Severino**, pela participação essencial e ricas contribuições científicas neste trabalho, disponibilizando dados para respaldar as análises deste estudo. Agradeço ainda a produtiva parceria estabelecida.

À **Profa Dra Eloiza Helena Tajara da Silva**, coordenadora do Projeto Temático "Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço" (FAPESP 04/12054-9), agradeço a parceria e a obtenção das amostras utilizadas neste trabalho, por meio da colega **Camila**.

Aos pesquisadores integrantes do grupo GENCAPO, agradeço por participar das enriquecedoras discussões que foram muito importantes para ampliar os meus horizontes na área de câncer e para o desenvolvimento crítico em pesquisa.

À querida amiga **Tessa Botelho**, pessoa admirável, iluminada e muito amada, agradeço de coração pela amizade sincera, confiança e grandes oportunidades oferecidas, tão importantes para o meu crescimento pessoal e profissional. Ainda, pelos momentos inesquecíveis de vida compartilhados.

À querida amiga **Camila Rodini**, agradeço toda amizade, cumplicidade e os conselhos que sempre me acalentaram, além da presença constante desde o início do doutorado, que tanto me permitiu aprender, compartilhando as suas experiências. Você foi muito importante na concretização deste trabalho.

À querida amiga **Katiúscia Paiva,** exemplo de determinação e competência, pela amizade, conhecimento transmitido e todo estímulo e incentivo essenciais em diversos momentos. Agradeço também a ajuda imprescindível na realização deste trabalho.

Às queridas amigas **Marina de Deus Lima** e **Tatiana Libório**, pessoas muito especiais, pela amizade, companheirismo e convívio dentro e fora da Faculdade. Vocês são grandes conquistas que levarei para sempre comigo.

A todos os colegas e amigos do laboratório de Patologia Molecular, em especial, **Patrícia Adachi, Fábio Coracin, Márcia Campos, Thaís Acquafreda, Ricardo Shié, Maria Fernanda, Camila Gallo e Fernanda Amorin,** pelo convívio, respeito, troca de conhecimentos e amizade nesses últimos anos.

A todos os colegas e amigos da Patologia Bucal que tive o prazer de conviver**, Hélder e Flávia Pontes, Sérgio Cury, Serginho, Yonara, Fernandinha, Bruno, Kívia, Renata Acay, Paulo Santos, Alexandra, Alexandre Medeiros, Juliana, Roberto, Cristhiane Leite, Aluana, Fernanda Giudice, Fátima, Érica, Luciana, Fabiana e Márcio,** pela amizade conquistada e convivência harmoniosa.

A todos os demais **colegas do curso de Pós-Graduação** pelo compartilhamento de experiências e saudável convívio.

As funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal **Elisa e Edna (*in memorian),*** pessoas de grande importância no meu aprendizado laboratorial, com as quais tive momentos agradáveis e sinceros. Agradeço ainda, pela ternura e acolhida carinhosa ainda antes do ingresso no curso.

As funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal **Zilda, Néia e Nair,** minha gratidão pela presteza, disponibilidade e atenção sempre que foi preciso.

As funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal **Bia, Débora e Edna** pelo convívio, carinho e cuidado sempre dispensados.

Às bibliotecárias da USP, em especial a **Glauci**, pela fundamental contribuição na confecção desta tese.

Ao apoio financeiro do **Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, que viabilizou a minha dedicação exclusiva para cursar o doutorado na Patologia Bucal.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o meu percurso no doutorado da FOUSP.

Dificuldades e obstáculos são fontes valiosas

de saúde e força para qualquer sociedade.

Albert Einstein

Xavier FCA. Expressão de transcritos de genes localizados no cromossomo 11q em carcinoma epidermóide de boca e sua relação com critérios de agressividade [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

A instabilidade genética é um importante evento associado ao carcinoma epidermóide de boca, sendo alterações na região cromossômica 11q constantemente relatadas. Neste estudo, genes localizados na região cromossômica 11q, especificamente os genes *CTTN*, *PPFIA1*, *SHANK2*, *TAOS1* e *MMP-7*, foram investigados quanto a diferenças de expressão de transcritos entre carcinomas epidermóides de boca e suas margens correspondentes. A expressão desses genes foi relacionada com aspectos clínicos e histológicos, com critérios de agressividade estabelecidos, e com a sobrevida dos pacientes. Foram analisadas pela técnica de qRT-PCR 29 amostras congeladas de tumores e 25 margens. Todos os genes apresentaram maiores valores de expressão nos tumores em comparação com as margens, embora apenas o gene *MMP-7* tenha exibido valores estatisticamente significantes. A expressão do gene *MMP-7* mostrou fraca associação com tumores menos agressivos, e os outros genes apresentaram maiores valores de expressão em tumores mais agressivos, sem significância estatística. Não houve diferença estatística entre a freqüência das variáveis clínicas e histopatológicas com a expressão dos genes estudados, porém o *PPFIA1* demonstrou maiores níveis de expressão em tumores de assoalho. Em relação à sobrevida, a expressão elevada de *PPFIA1* pode implicar em um maior risco de óbito. Assim, é possível a participação do gene *MMP-7* no desenvolvimento da neoplasia, e a relação do *PPFIA1* com o risco de óbito, porém a expressão de transcritos dos genes *CTTN*, *SHANK2*, *TAOS1* e *MMP-7* não pode ser relacionada com agressividade tumoral e prognóstico.

Palavras-Chave: Carcinoma Epidermóide - Cromossomo 11 - RT-PCR

Xavier FCA. Expressão de transcritos de genes localizados no cromossomo 11q em carcinoma epidermóide de boca e sua relação com critérios de agressividade [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Genetic instability is an important event associated with oral squamous cell carcinoma, and alterations in the chromosome region 11q are constantly reported. In this study, genes located on chromosome region 11q, specifically genes *CTTN*, *PPFIA1*, *SHANK2*, *TAOS1* and *MMP-7*, were investigated for differences in the expression of transcripts in oral squamous cell carcinoma and their corresponding margins. The expression of these genes was correlated with clinical and histological aspects, aggressiveness criteria established, and with patient survival. Twenty-nine frozen samples of tumors and 25 samples of margin tissue were analyzed using qRT-PCR. All genes showed a higher expression in tumors, compared with the margins, although only the *MMP-7* gene demonstrated statistically significant values. The expression of the *MMP-7* gene showed weak association with less aggressive tumors, and the other genes showed higher expression in more aggressive tumors, without statistical significance. There was no statistical difference between the frequency of clinical and histopathological variables and the expression of genes studied, however the *PPFIA1* gene demonstrated higher levels of expression in tumors of the floor of mouth. With regard to survival, the high expression of *PPFIA1* may imply a greater risk of death. Thus, it is possible that the *MMP-7* gene participates in the development of malignancy, and *PPFIA1* expression may also be associated with risk of death, however, the expression of transcripts of the *CTTN*, *SHANK2*, *TAOS1* and *MMP-7* genes may not be related to tumor aggressiveness and prognosis.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma - Chromosome 11 - RT-PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Cromossomo 11 com mapeamento físico da localização dos 12 genes conhecidos na região de 1,6 Mb entre as posições 11q12.3 e 11q13.5 .. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Seqüência e orientação dos iniciadores utilizados para amplificação por qRT-PCR, segundo o gene, número de acesso no Gene Bank, e tamanho do produto 47

Tabela 5.1- Número e distribuição percentual das informações clínicas, anátomo-patológicas e do desfecho clínico dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca 53

Tabela 5.2- Número e distribuição percentual das informações clínicas, anátomo-patológicas em relação à agressividade tumoral dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca 55

Tabela 5.3- Número e distribuição percentual das informações clínicas, anátomo-patológicas em relação à recorrência tumoral dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca 57

Tabela 5.4- Número e distribuição percentual das informações clínicas, anátomo-patológicas em relação à ocorrência de óbito dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca 59

Tabela 5.5 - Comparação das medidas da expressão dos genes alvos CTTN, MMP-7, PPFIA1, SHANK2 e TAOS1 segundo dois grupos definidos como tumor e margem. Teste não paramétrico Wilcoxon..... 63

Tabela 5.6 - Comparação das medidas da expressão dos genes alvos segundo dois grupos definidos como tumores mais e menos agressivos. Teste t-student (CTTN e SHANK2); Mann Whitney (MMP-7, PPFIA1 e TAOS1) . 65

Tabela 5.7 - Comparação das medidas da expressão dos genes alvos CTTN, MMP-7, PPFIA1, SHANK2 e TAOS1 nos grupos de tumores mais e menos agressivos em relação a suas margens correspondentes. Teste não paramétrico Wilcoxon 65

Tabela 5.8 - Resultado dos testes Mann-Whitney e t-student para associação da expressão dos 5 genes alvos em tumores com os dados clínicos e histopatológicos 67

Tabela 5.9 - Análise da curva ROC na definição de pontos de corte para agressividade 68

Tabela 5.10 - Sobrevivência média categorizada e teste do log-rank para cada um das variáveis avaliadas 70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Distribuição dos valores das medianas de expressão dos genes alvos CTTN, MMP-7, PPFIA1, SHANK2 e TAOS1 em amostras de tecido tumoral 62

Gráfico 5.2 - Distribuição dos valores das medianas de expressão dos genes alvos CTTN, MMP-7, PPFIA1, SHANK2 e TAOS1 em amostras de margens ... 62

Gráfico 5.3 - Gráficos da distribuição dos valores de expressão de cada gene, de acordo com os grupos de tumores mais e menos agressivos, bem como nas suas margens correspondentes 66

Gráfico 5.4 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para os 29 indivíduos avaliados 69

Gráfico 5.5 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos com idade menor que 60 anos e indivíduos com idade maior ou igual a 60 anos obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo 71

Gráfico 5.6 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para tumores localizados em língua e em assoalho obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo 72

Gráfico 5.7 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos tabagistas e que fumaram no passado obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo 72

Gráfico 5.8 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos etilistas e que beberam no passado obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo 73

Gráfico 5.9 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier tumores com expressão acima ou abaixo do ponto de corte da expressão de PPFIA1 para diagnóstico de agressividade, obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo 74

Gráfico 5.10 - Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para tumores com expressão acima ou abaixo do ponto de corte da expressão de TAOS1 para diagnóstico de agressividade, obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo 74

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO 18

2 REVISÃO DA LITERATURA 20

2.1 Carcinoma epidermóide de boca 20

2.1.1 Sistema TNM e aspectos prognósticos do carcinoma epidermóide de boca ... 23

2.2 Alterações cromossômicas no câncer 27

2.2.1 Alterações da região cromossômica 11q13 32

3 PROPOSIÇÃO 40

4 MATERIAL E MÉTODOS 41

4.1 Critérios de seleção 41

4.2 Casuística e Dados dos pacientes 42

4.3 Obtenção do RNA total 43

4.4 Transcrição reversa 44

4.5 PCR quantitativo em tempo real (qPCR) 45

4.6 Análise estatística 47

5 RESULTADOS 51

5.1 Caracterização dos casos 51

5.1.1 Associação das variáveis clínicas e anátomo-patológicas com agressividade tumoral 54

5.1.2 Associação entre as variáveis clínicas e e anátomo-patológicas com recorrência 56

5.1.3 Associação entre as variáveis clínicas e anátomo-patológicas com ocorrência de óbito 58

5.2 Análise da Expressão gênica 60

5.2.1 Distribuição das medidas de expressão dos genes estudados 60

5.2.2 Comparação das medidas de expressão em Tumor e Margem para os genes estudados 63

5.2.3 Comparação das medidas de expressão nos grupos de Tumores mais e menos agressivos para os genes estudados 64

5.2.4 Associação das medidas de expressão dos genes-alvo com as variáveis clínicas e histopatológicas 67

5.3 Definição dos pontos de corte de agressividade da curva ROC 68

5.4 Análise de sobrevida 69

5.4.1 Correlação com variáveis clínicas e expressão dos genes PPFIA1 e TAOS1 . 70

6 DISCUSSÃO 75

7 CONCLUSÕES 94

REFERÊNCIAS 95

APÊNDICE 113

ANEXOS 114

1 INTRODUÇÃO

Entre as alterações genéticas encontradas no câncer certamente estão as aberrações cromossômicas. No câncer da região de cabeça e pescoço, as mais frequentes envolvem ganhos em 3q, 8q, 9q, 20q, 7p, 11q13, e 5p e perdas em 3p, 9p, 21q, 5q, 13q, 18q, e 8p (GOLLIN, 2001). A região cromossômica 11q13 foi descrita como alterada em diferentes neoplasias, inclusive em carcinomas epidermóides de boca (HUANG et al., 2006; MARTIN et al., 2008). Atualmente, as pesquisas científicas se direcionam na busca por marcadores moleculares diagnósticos ou prognósticos para o câncer, no intuito de contribuir diretamente no refinamento diagnóstico, na individualização terapêutica bem como no desfecho clínico da doença. Uma vez que lesões clínica e histologicamente semelhantes podem apresentar diferentes desfechos e respostas ao tratamento, esses marcadores são fontes valiosas de melhores perspectivas que podem favorecer a compreensão do processo de carcinogênese, porém ainda têm contribuído de forma limitada para a aplicação clínica.

Alinhado com essa característica da literatura atual, o Laboratório de Patologia Molecular da FOUSP participa atualmente do Projeto Temático “Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço” (FAPESP 04/12054-9), sob coordenação da Profa Dra Eloiza Helena Tajara da Silva, que envolve cerca de 80 pesquisadores de nove Instituições diferentes em quatro cidades do Estado de São Paulo (Ribeirão Preto, São José dos Campos, São José do Rio Preto, São Paulo) responsáveis pela coleta e armazenamento dos dados clínicos, coleta e processamento do material biológico, bem como realização de

experimentos de *microarray* (análise de microarranjo de DNA), expressão gênica, polimorfismos e proteômica. Como subprojeto deste Projeto Temático, o presente trabalho utilizou alguns dados gerados por um *microarray* contendo 55.000 genes e a partir do perfil de expressão gênica global de amostras de carcinoma epidermóide de boca, selecionou alguns genes localizados no braço longo do cromossomo 11 identificados como hiper-expressos (*PPFIA1*, *CTTN*, *SHANK2* e *MMP-7)*. A escolha desses genes para validação por qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa) em um grupo amostral maior se fez necessária no intuito de legitimar a utilidade desses genes como marcadores moleculares no carcinoma epidermóide de boca. O gene *TAOS1*, também localizado na região cromossômica 11q13, já foi descrito como alterado no câncer de boca (HUANG et al., 2002; HUANG et al., 2006; TAN et al., 2008), e por isso foi incluído na análise.

Assim, o presente estudo teve como objetivo quantificar por meio de qRT-PCR os transcritos de alguns genes da região cromossômica 11q13 como *PPFIA1, CTTN, SHANK2, TAOS1* e o gene *MMP-7* em carcinomas epidermóides de boca bem como em suas margens não tumorais correspondentes. Buscou-se, ainda, verificar se as possíveis diferenças de expressão dos genes tiveram relação com parâmetros clínicos (estádio da doença ou evolução) e histopatológicos, podendo revelar gene ou um grupo deles como marcadores moleculares relevantes de prognóstico e/ou agressividade tumoral o que, em última instância, poderá resultar em benefícios para os pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide de boca

O câncer de cabeça e pescoço é uma doença de elevada prevalência mundial, cuja incidência é de 500.000 novos casos por ano (MAMELLE et al., 1994), sendo que 40% dos casos acometem a cavidade bucal. No Brasil, o câncer de boca é um problema de saúde pública, sendo classificado como o 5º tipo mais freqüente entre os homens (com 10.380 casos estimados) e o 7º entre as mulheres (com 3.780 casos estimados) no ano de 2008, de acordo com os registros do INCA (BRASIL, 2007). Em países em desenvolvimento do mundo, corresponde a terceira neoplasia mais comum (LIN et al., 2002; LO et al., 2003). Dentre as neoplasias bucais, o carcinoma epidermóide corresponde à cerca de 95% dos casos, sendo caracterizado como uma neoplasia epitelial maligna agressiva. Apresenta importante morbidade por comprometer funções como a fala e a deglutição (DIMERY; HONG, 1993), e estima-se que a taxa de mortalidade seja de 50% dos casos em 5 anos, sem mudanças significativas nos últimos 50 anos, apesar do desenvolvimento técnico-científico (KADEMANI, 2007; PARKIN et al., 2005).

O carcinoma epidermóide de boca afeta principalmente homens numa faixa etária acima de 40 anos (HECHT, 2003; HUNTER; PARKINSON; HARRISON, 2005), com a incidência aumentando progressivamente com a idade até 65 anos e depois se estabilizando (BROUMAND; LOZANO; GOMEZ, 2006). Os principais sítios de acometimento intra-bucais são a língua, assoalho bucal, rebordo alveolar, trígono

retro-molar, mucosa jugal, e palato (KADEMANI et al., 2005), sendo que mais de 50% dos casos ocorrem em assoalho e borda/ventre de língua (KADEMANI et al., 2005; MASHBERG; BARSA, 1984). Os pacientes acometidos comumente apresentam exposição aos principais fatores de risco conhecidos para a doença como uso de tabaco e álcool. O uso do tabaco é considerado o principal fator de risco (HECHT, 2003; HUNTER; PARKINSON; HARRISON, 2005), nas suas diversas formas de consumo (inalado, aspirado ou mascado), sendo os seus efeitos maléficos relacionados à dose e ao tempo de exposição (HECHT, 2003). O consumo de álcool em associação ao tabaco aumenta ou potencializa o risco de desenvolver a doença, atuando como promotor. Acredita-se que o álcool funcione como irritante local e solvente para as substâncias carcinogênicas encontradas no tabaco, e atuando ainda em enzimas da família do citocromo p450, conhecidas por ativarem pro-carcinógenos (HECHT, 2003; HUNTER; PARKINSON; HARRISON, 2005).

O recurso diagnóstico de rotina para o carcinoma epidermóide é o exame histopatológico aliado a estudos imuno-histoquímicos, que juntamente com os indicadores de prognóstico utilizados, tais como o estadiamento clínico e a graduação histológica do tumor, ainda não conseguem contribuir na predição fidedigna do comportamento tumoral (LE TOURNEAU et al., 2005).

O tratamento do carcinoma epidermóide de boca consiste em excisão cirúrgica ou radioterapia, como tratamento curativo de escolha, ou de forma combinada para casos em estágios avançados da doença. Quimioterapia suplementar adjuvante é ocasionalmente utilizada para obter um melhor controle loco-regional ou à distância, bem como em casos de recidiva (KADEMANI et al., 2005; PARISE JR, 2000). Apesar das melhorias nos protocolos terapêuticos, a doença ainda apresenta alta morbidade e mortalidade.

A despeito dos grandes avanços tecnológicos nas ferramentas diagnósticas, poucos benefícios foram obtidos para melhoria do prognóstico do carcinoma epidermóide de boca nas últimas duas décadas, permanecendo sua caracterização como uma das neoplasias mais agressivas. A fim de obter melhores desfechos para esta doença, é importante distinguir os pacientes de alto risco com intuito de elaborar protocolos de tratamento individualizados. Embora a análise histopatológica convencional permita um diagnóstico preciso quando a neoplasia está instalada, esta ferramenta torna-se limitada para definir os diferentes graus ou estádios do tumor.

Sabe-se que o comportamento biológico do tumor sofre primeiramente interferência de alterações genéticas nas células tumorais. Para se aperfeiçoar as estratégias de tratamento e diminuir os índices de morbidade e mortalidade dos pacientes, é necessário esclarecer os padrões genéticos e moleculares básicos das neoplasias malignas de cabeça e pescoço (SOMOZA-MARTÍN et al., 2005; SWANGO, 1996). Além disso, a identificação de biomarcadores moleculares que possibilitem o diagnóstico precoce da doença, bem como que contribuam para o estabelecimento dos riscos de recorrência e para o planejamento terapêutico culminaria, então, em melhores perspectivas prognósticas (GINOS, et al., 2004; SMITH; HAFFTY; SASAKI, 2001).

2.1.1 Sistema TNM e aspectos prognósticos do carcinoma epidermóide de boca

O sistema TNM (T= tumor; N= linfonodos e M= metástases a distância) para classificação de tumores malignos foi desenvolvido por Pierre Denoix na França entre os anos de 1943 e 1952 (DENOIX, 1944). A *Union Internationale Contre lê Câncer* (UICC) e a *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) adaptaram o sistema TNM, que está publicado em sua sexta edição do ano de 2002, e classificaram o estadiamento clínico do câncer de cabeça e pescoço que se origina em mucosa em sete estádios diferentes (0, I, II, II, IVa, IVb, IVc), considerando-se a disseminação local do tumor (T1-4), o envolvimento de linfonodos regionais (N0-3) e a presença de metástases a distância (M0-1) (GREENE et al., 2002; SOBIN; WITTEKIND, 2002). O objetivo deste sistema é guiar o planejamento do tratamento, oferecendo ao paciente uma estimativa do seu prognóstico, e ainda a avaliação da uniformidade de dados e dos resultados do tratamento entre diferentes instituições. É um sistema universalmente aplicável que facilita a comunicação inter-profissional. Acredita-se que tumores em um mesmo sítio da cabeça e pescoço, com histologia específica, e que compartilha da mesma combinação TNM, apresentem o mesmo comportamento (VAN DER SCHROEFF; DE JONG, 2009). Ainda, o estadiamento auxilia na definição do prognóstico, quanto a chances de disseminação neoplásica, sobrevida livre de doença e sobrevida global. Considerando-se os extremos, o estádio I corresponde à lesão pequena restrita a cavidade bucal com elevado índice de controle, enquanto o estádio IV apresenta maiores dificuldades para o planejamento terapêutico cujos resultados são usualmente precários.

O sistema TNM é classificado em TNM clínico (cTNM) e TNM patológico (pTNM). O cTNM baseia-se no exame clínico podendo utilizar exame auxiliar de imagem. O pTNM é definido após a análise histopatológica da peça, e geralmente é utilizada para o planejamento de terapia adjuvante e oferece maior acurácia sobre o prognóstico, sendo então considerado superior que o cTNM. Quando o tratamento é não-cirúrgico, o estadiamento patológico não é possível (VAN DER SCHROEFF; DE JONG, 2009).

O sistema de classificação TNM mostrou ser um indicador confiável de prognóstico do paciente, com o tamanho do tumor e o comprometimento de linfonodos cervicais sendo os dois aspectos de maior significância em afetar a sobrevida do paciente, contudo, torna-se uma ferramenta limitada para definir o comportamento biológico individual do tumor (KADEMANI et al., 2005). Tipicamente, lesões T1-T2 estão associadas com o risco de metástases regionais em 10% a 30% dos casos respectivamente, enquanto que lesões T3-T4 apresentam risco significantemente maior de doença regional do pescoço (LEEMANS et al., 1994; SHAH et al., 1976).

Ainda existem diversos indícios de que o sítio do tumor primário, em particular a profundidade da invasão, apresente implicações prognósticas, uma vez que os tumores se comportam diferentemente a depender da localização anatômica. A localização dos tumores em língua e assoalho tendem a apresentar metástases linfáticas mais precocemente do que em mucosa jugal e palato devido à proximidade com a rica rede linfática e vascular (MARTINEZ-CONDE et al., 2001; SPIRO et al., 1986). Porém, Kademani et al. (2005) não observou evidência do sítio primário do tumor afetar a sobrevida ao analisar em 233 pacientes, 7 sítios de acometimento intra-bucais. Recentes estudos (de ARAÚJO et al., 2008; COSTA; ARAÚJO JR;

RAMOS, 2005; COSTA et al., 2002) corroboram com os primeiros autores ao evidenciar uma correlação estatisticamente significante entre o cTNM e a localização anatômica da lesão, uma vez que grande parte dos casos de tumores de língua foram observados em estádio III ou IV, e tumores de assoalho e palato mole em estádio IV, portanto estas variáveis tratam-se de fatores prognósticos importantes em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca. Dib et al. (1994) e Urist, O'Brien e Soong (1987) justificam que a língua e assoalho exibem pior prognóstico da doença devido a presença frequente de metástases cervicais nestes casos.

Dentre os diversos parâmetros histopatológicos dos tumores primários sugeridos como fatores prognósticos para ser aplicado a nível clínico, estudos recentes apontam que a profundidade da infiltração tumoral e o estádio pT consegue uma melhor predição de comprometimento nodal oculto, enquanto que apenas o estádio pT prediz recorrência local. Não foi encontrado um valor de corte específico da profundidade de infiltração que conseguisse separar pacientes de alto e baixo risco, e nem correlações significantes entre parâmetros histopatológicos e sobrevida (KESKI-SÄNTTI et al., 2007). Contudo, a graduação histológica não está incluída no sistema TNM e o seu valor prognóstico permanece controverso (ODELL; JANI; SHERRIFF, 1994), apesar dos achados de Kademani et al. (2005) indicarem que tumores pouco diferenciados são mais prováveis de apresentarem-se com metástases cervicais no momento do diagnóstico, além da maior possibilidade de exibirem margens comprometidas e associação com diminuição da sobrevida dos pacientes quando comparadas com outros grupos.

Estádios III e IV estão mais relacionados à presença de infiltração neural e embolização linfática em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca,

denotando que pacientes com estádio clínico IV apresentam doença ativa ou recorrente com menor tempo de sobrevida (DIB et al., 1994), enquanto pacientes em estádio I e II encontram-se livre da doença com seguimento de 5 anos (ARAÚJO JR; COSTA; RAMOS, 2006). A invasão perineural aparentemente correlaciona-se com maior probabilidade de metástases regionais, maior invasão tumoral, menor diferenciação, e taxas de sobrevivência menor em 5 anos. A espessura também não é considerada no TNM, mas deve ser levada em consideração. Uma espessura tumoral superior a 2 mm é um forte fator preditivo de metástases nodais ocultas, devendo-se indicar um esvaziamento eletivo do pescoço. Lesões superficiais apresentam sobrevida significativamente maior que lesões infiltrativas em profundidade (LARSEN et al., 2009; PARISE JR, 2000).

Chen et al. (2007) sugeriram ainda fatores preditivos de sobrevivência em carcinomas epidermóide de boca e de faringe como grupo étnico, época do diagnóstico, sexo, idade, sítio anatômico, tipo morfológico e tipo de terapia. Porém parâmetros geralmente utilizados para julgar a adequação do tratamento ou o valor prognóstico de um possível marcador são tempo livre de doença, recidiva local, recidiva regional (metástases linfáticas), e sobrevida (geralmente após um período de seguimento de 5 anos) (PARISE JR, 2000).

Como limitações do sistema TNM vale ressaltar que a avaliação do tumor em diferentes instituições é subjetiva em decorrência das diferenças nas ferramentas diagnósticas, a disponibilidade das mesmas no momento do diagnóstico e a discrepância da análise inter- e intra-observador. A classificação atual ainda se baseia apenas na morfologia tumoral e não considera fatores prognósticos relacionados ao paciente como idade, sexo e co-morbidades, nem mesmo fatores como marcadores biológicos e moleculares. Portanto, o sistema atual de

estadiamento TNM não é totalmente preciso para fornecer um prognóstico individualizado (VAN DER SCHROEFF; DE JONG, 2009).

2.2 Alterações cromossômicas no câncer

O crescimento celular normal é um equilíbrio delicado entre a proliferação e a morte celular programada (apoptose). O câncer é um distúrbio desta homeostase, resultando no favorecimento da proliferação em detrimento da morte celular. Nas últimas décadas, ficou estabelecido que a proliferação celular é regulada por genes, e que embora casos de câncer possam resultar da predisposição genética causada por alterações na linhagem germinativa celular, elevando o risco do desenvolvimento da doença, o câncer é prioritariamente uma doença genética das células somáticas (CAVENEE; WHITE, 1995; WEINBERG, 1996), em que as características biológicas primárias de tumores são determinadas por alterações genéticas nas células tumorais, o que pode representar informações importantes para auxiliar a terapêutica e predição do prognóstico do paciente (UCHIDA et al., 2006).

Embora diversas alterações genéticas já tenham sido descritas para o carcinoma epidermóide de boca, a adequada compreensão dos fenômenos decorrentes permanece limitada. Baseada em estudos genéticos, surgiu a teoria do modelo de progressão para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide bucal. Na fase inicial, uma célula-tronco do epitélio bucal adquire uma alteração genética, posteriormente um fragmento conhecido por *patch* é formado, sendo este uma unidade clonal composta de célula-tronco e células-filhas que compartilham as mesmas alterações no DNA. Subsequentemente existe a conversão do *patch* em um

campo em expansão, resultante de alterações genéticas adicionais. Em última análise, a seleção clonal leva ao desenvolvimento do carcinoma dentro deste campo contíguo de células pré-neoplásicas (BRAAKHUIS; LEEMANS; BRAKENHOFF, 2004).

A progressão tumoral é ativada por aberrações significativas em genes que regulam positivamente ou negativamente funções de proliferação, apoptose, a estabilidade do genoma, angiogênese, invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Vários estudos têm revelado numerosas alterações moleculares tumor-específicas nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, incluindo o de boca, como a ativação de oncogenes (CALLENDER et al., 1994; DASSONVILLE et al., 1993; KIARIS et al., 1995), a inativação de genes supressores de tumor (KOCH et al., 1996; REED et al., 1996) e a perda da heterozigose em vários locais cromossômicos (BEDER et al., 2003; TAKEBAYASHI et al., 2000). Até hoje, mais de 2000 genes já foram associados com o carcinoma epidermóide de boca (IBRAHIN et al., 2003). Acredita-se que esses tumores se desenvolvem como resultado da perda de regulação de múltiplos genes (LENGAUER; KINZLER; VOGELSTEIN, 1998; RESHMI et al., 2004), parecendo ser necessário alterações em 3, 6 ou ainda mais genes para o desenvolvimento tumoral (CAVENEE; WHITE, 1995; WEINBERG, 1996). O câncer de boca caracteriza-se assim por um grande número destas alterações genéticas e as investigações se concentram na identificação dos eventos críticos e nas etapas em que estes ocorrem durante a carcinogênese (ALBERTSON et al., 2003).

De forma abrangente, análises citogenéticas e genéticas moleculares em carcinoma epidermóide de boca revelaram perdas cromossômicas em 3p, 4p, 8p, 11q, e 18q, e ganhos em 3q, 5p, 7p/q, 8q, 9q, 11q, 14q, 19q, e 20q (GOLLIN, 2001;

JIN et al., 1995; JIN et al., 2006a; LESE et al., 1995; MARTIN et al., 2008; SPEICHER et al., 1995; WREESMANN; SINGH, 2005;). Uma vez que alterações cromossômicas numéricas e estruturais são responsáveis pelo acúmulo de aberrações genéticas que conduzem ao desenvolvimento e progressão tumoral (SAUNDERS et al., 2000), Weber et al. (1998) compararam o número de aberrações genéticas em 12 lesões cancerizáveis e em 14 casos de carcinomas epidermóides de boca. O número médio de aberrações aumentou significantemente entre as duas lesões em 3,2 ± 1,2 para 11,9 ± 1,9, respectivamente. Okafuji et al. (2000) também encontraram aumentos significativos no número de aberrações com a evolução do tamanho tumoral em carcinoma epidermóide de boca (média de 3,25 para tumores T1 contra média de 7,71 para tumores T2), corroborando com a teoria de Lengauer, Kinzler e Vogelstein (1998), na qual um acúmulo de mutações ocorre com a progressão da tumorigênese. É importante ressaltar que uma mutação é definida como qualquer alteração na sequência do genoma. Estas alterações incluem as que afetam pares de base únicos, bem como aquelas que criam grandes ou pequenas deleções ou inserções, amplificações ou translocações (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004).

Neste contexto, a função gênica pode ser alterada em diferentes vias da inativação de genes supressores tumorais através de mutação, deleção ou metilação; e a ativação de oncogenes podendo ocorrer por mutação ou amplificação (REID et al., 1997; VAN HOUTEN et al., 2000). Amplificações cromossômicas do DNA são uma das manifestações das instabilidades genômicas do câncer que resultam no aumento do número de cópias de um gene. Não devem ser confundido com aumento da expressão gênica, embora a amplificação geralmente resulte em níveis elevados de produtos gênicos. A amplificação é um mecanismo pelo qual as

células podem atender à demanda para síntese de produtos de genes específicos, excedendo a capacidade transcricional de uma única cópia de um gene (SCHWAB, 1999). Esse mecanismo pode permitir as células elevarem a expressão gênica, contribuindo para a o desenvolvimento/progressão do câncer ou ainda permitindo uma maior expressão de oncogenes. Os mecanismos pelos quais a amplificação do DNA acontece no câncer têm sido estudados para diversos genes, principalmente aqueles envolvidos na resistência a drogas citotóxicas (GIBCUS et al., 2007). Estas alterações estão presentes em tumores de cabeça e pescoço, dentre eles o carcinoma epidermóide de boca (BALDWIN et al., 2005; CHOI; CHEN, 2005; SNIJDERS et al., 2005; SPARANO et al., 2006). Técnicas que identificam essas alterações são utilizadas com sucesso na identificação de marcadores prognósticos para respostas terapêuticas (ALBERTSON, 2006; MORRISON et al., 2006).

A genética do câncer obteve grandes avanços nos últimos 30 anos em decorrência da evolução das técnicas de citogenéticas clássica e molecular (FISH, *Fluorescence in situ Hybridization*, e CGH, *Comparative genome hybridization*), que são críticas para o entendimento de alterações no câncer (PATMORE et al., 2005). A identificação de aberrações citogenéticas em uma lesão permite a caracterização molecular de pontos de quebra cromossômica (*breakpoints*), identificação de genes envolvidos e descrição de condições patológicas moleculares na malignidade. A técnica de hibridação genômica comparativa baseada em arranjos (CGH-*array*) e a hibridização *in situ* por multifluorescência, além de complementarem os métodos de citogenética clássica, têm sido utilizadas para caracterizar o perfil genético de diversos tumores sólidos, contribuindo de maneira significativa para a compreensão dos eventos genéticos que controlam a tumorigênese, progressão e o processo de metástase no câncer (PATMORE et al., 2005). A tecnologia do CGH-*array*

especificamente foi desenvolvida para permitir detecção do aumento ou redução do número de cópias em regiões cromossômicas específicas em alta resolução, facilitando mapeamento refinado de alterações e, com isso a descoberta de novos oncogenes e supressores tumorais. (ALBERTSON et al., 2000; BRUDER et al., 2001).

Estudos recentes em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca demonstraram que as perdas em regiões cromossômicas estão associadas a genes supressores tumorais, sendo que múltiplas regiões de perdas foram observadas no braço curto do cromossomo 3 (MARTIN et al., 2008). Ainda, perdas em 3p são eventos precoces em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, com ausência deste evento em lesões com displasia epitelial de boca (CALIFANO et al., 1996; ROSIN et al., 2002; ROZ et al., 1996). Deleções em genes supressores tumorais p15/CDKN2B ou p16/CDKN2A, localizados no cromossomo 9p, exibem também importância no desenvolvimento desses tumores (MARTIN et al., 2008). Resultados de estudos através de CGH-*array* de 31 linhagens de carcinoma epidermóide de boca revelaram tanto perda de material cromossômico a partir da região 11q22 e amplificação de banda cromossômica 11q13 (MARTIN et al., 2008). Além disso, ganhos no cromossomo 7p, previamente demonstrado por análise citogenética clássica e por CGH-*array* (GOLLIN, 2001) também têm sido observados em linhagens de carcinoma epidermóide de boca (MARTIN et al., 2008).

A associação de alterações como amplificações e deleções gênicas, identificadas através da técnica de CGH-*array*, com a expressão gênica em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço ainda é limitada (JÄRVINEN et al, 2008). Sabendo-se que amplificações do DNA cromossômico resultam em aumento do número de cópias de um gene, sendo mecanismo bem estabelecido para as

células elevarem a expressão gênica (ALBERTSON, 2006; MORRISON et al., 2006), estudos que associem essas técnicas com as análises de microarranjo de DNA (*microarray*) e qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa) são úteis para traçar as ferramentas moleculares que identifiquem alterações consistentes a nível genômico e de transcriptoma.

2.2.1 Alterações da região cromossômica 11q13

Os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço apresentam amplificações em regiões genômicas específicas, principalmente, amplificações de sequências de DNA na banda cromossômica 11q13, em que comparações entre a citogenética clássica e as análises através de CGH-*array* confirmaram a amplificação desta região em aproximadamente 50% dos casos de carcinoma epidermóide de boca, sendo a anormalidade mais frequentemente demonstrada por ambas às tecnologias (bandeamento cromossômico e CGH-*array*) (GOLLIN, 2001; MARTIN et al., 2008; SAUNDERS et al., 2000). Amplificações da região 11q13 também têm sido observadas em casos de carcinoma de esôfago, mama, pulmão, rim e pâncreas (GANSAUGE et al., 1997; HUANG et al., 2002; PROCTOR et al., 1991; SCHUURING, 1995). Em carcinoma epidermóide de boca (HUANG et al., 2006) e em cabeça e pescoço de maneira geral (AKERVALL et al., 1995; AKERVALL et al., 1997), esta alteração tem sido associada a um desfecho desfavorável, além de estar relacionada com a diminuição na sobrevida em câncer esofágico (KITAGAWA et al., 1991), aumento do risco de recorrência em câncer de mama (BORG et al., 1991) e

pobre diferenciação tumoral em tumores de pulmão (BERENSON et al., 1990). Desta forma, se faz necessário o entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos nesta via, a fim de elucidar o perfil de tumores que exibem amplificação de genes desta região cromossômica.

Estudos em linhagens de carcinoma epidermóide de boca mapearam o fragmento 11q13 através de marcadores microssatélites, abrangendo uma região de 5 Mb contendo 23 genes conhecidos. De acordo com os resultados do referido estudo, o fragmento amplificado variou em tamanho, mostrando que uma região de sobreposição mínima de aproximadamente 1,5 Mb pode ser definida, e incluíam oito oncogenes conhecidos: *OCIM* (*MYEOV*), *CCND1* (*Cyclin D1*), *FGF9*, *FGF3*, *FGF4*, *FADD*, *PPFIA1*, *EMS1/cortactin* (*CTTN*) (HUANG et al., 2002). Outros estudos que mapearam o fragmento 11q13 através de CGH-*array* em 40 casos de carcinoma epidermóide de boca revelaram um tamanho consistente com 1.7 Mb, em que genes como *FGF3*, *CTTN*, e *SHANK2* mostraram-se coamplificados dentro da região do gene *CCND1* (FREIER et al., 2006). Ainda, resultados de Jin et al. (2006b) revelaram que amplificações do segmento 11q13 em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço sempre incluem um fragmento de 1.61 Mb que abrange 12 genes conhecidos (*CCND1*, *FGF3*, *FGF4*, *FGF19*, *CTTN*, *SHANK2*, *TPCN2*, *MYEOV*, *ORAOV1* (*TAOS1*), *YHEHHI6A*, *FADD*, *PPFIA1*) (Figura 2.1). Análises de expressão gênica também evidenciaram dados de hiper-expressão para os genes *CCND1*, *CTTN*, *SHANK2* e *TAOS1* em câncer de boca (FREIER et al., 2006; HUANG et al., 2002), bem como em diferentes neoplasias humanas para os genes *CCND1* (LAMMIE et al., 1991; SCHUURING et al., 1992), *CTTN* (SCHUURING et al., 1992), MYEOV (JANSSEN et al., 2002) e *EMSY* (HUGHES-DAVIES et al., 2003).

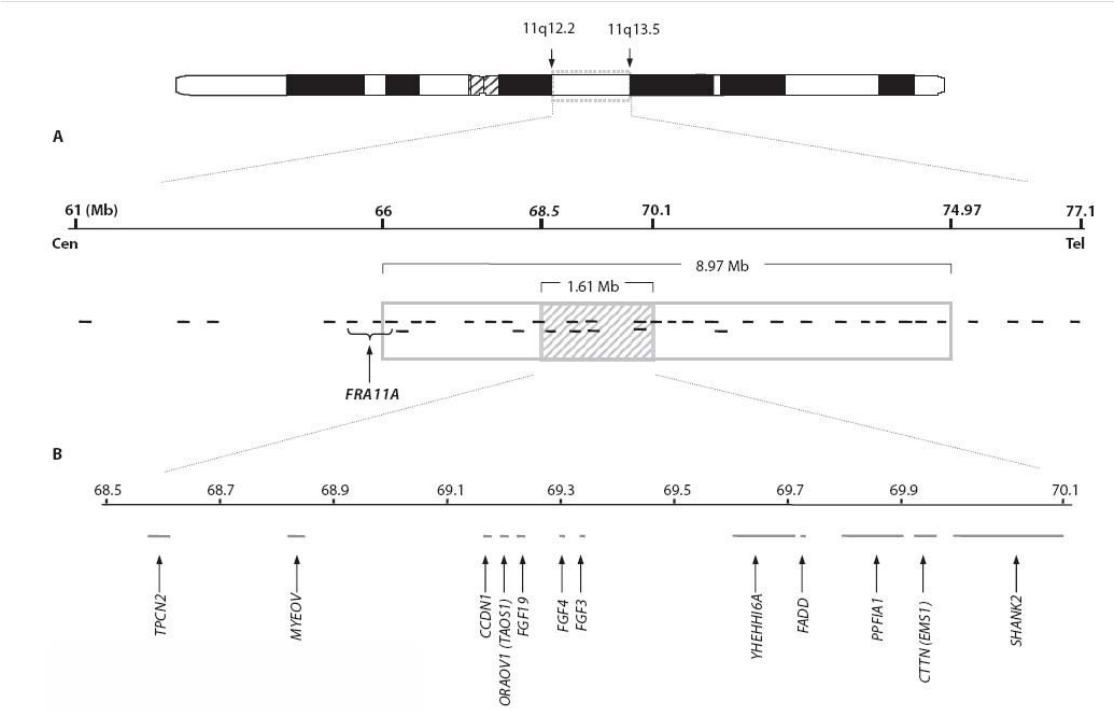


Figura 2.1 – Cromossomo 11 com mapeamento físico da localização dos 12 genes conhecidos na região de 1,6 Mb entre as posições 11q12.3 e 11q13.5. Fonte: Jin et al. (2006b)

Diversos genes hiper-expressos da região 11q13 estão funcionalmente relacionados, incluindo *CTTN* e *SHANK2* (FREIER et al., 2006). O *CTTN*, também conhecido como *EMS1*, Amplaxin, *SRC8* e Cortactina (por codificar uma proteína com este nome), refere-se ao substrato tirosino-quinase que está envolvido na reestruturação da actina do citoesqueleto cortical (WEED; PARSONS, 2001), funcionado na transdução de sinal entre sítios de contato célula-matriz e o citoesqueleto (SCHUURING et al., 1993; SCHUURING et al., 1998). A atividade da cortactina é regulada em parte pela fosforilação resultante da ativação de EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Ainda, a ativação de *Src*, MAPK e outras quinases citoplasmáticas conduzem também a fosforilação direta dos sítios tirosina e serina da cortactina em diferentes estágios (WEED; PARSONS, 2001). A

fosforilação do resíduo de serina pela MAPK tem sido proposta em regular a habilidade da cortactina em ativar N-WASp, proteína que regula a remodelação da actina no citoesqueleto (MARTINEZ-QUILES et al., 2004), indicando que as vias da *Src* e MAPK atuam na função da cortactina em participar da polimerização da actina (KELLEY; SHAHAB; WEED, 2008). Já a fosforilação do resíduo de tirosina da cortactina é necessária para a migração celular eficiente, estando associada à atividade de degradação da matriz em modelo animal de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (BOWDEN et al., 2006; LI et al., 2001).

Especificamente, a amplificação do gene *CTTN* e a super-expressão da proteína cortactina tem sido relacionada à reposta clínica desfavorável (RODRIGO et al., 2000), motilidade celular aumentada, invasão celular e metástase em carcinoma de cabeça e pescoço (ROTHSCHILD et al., 2006). Esses efeitos são provavelmente devido ao aumento da ligação entre a cortactina e o complexo Arp2/3, servindo para aumentar a atividade da actina Arp2/3 dentro da extensão citoplasmática tipo lamelipodia da célula tumoral. Esta extensão tipo lamelipodia refere-se a uma projeção da actina do citoesqueleto na extremidade de motilidade celular, oferecendo além da motilidade, maior potencial de invasão loco-regional e metástases a distância na célula tumoral. Assim, pode se estabelecer que a super-expressão de cortactina e amplificação de do gene *CTTN* estão correlacionados neste tipo de tumor (ROTHSCHILD et al., 2006).

Já o produto do gene *SHANK2* foi primeiramente identificado como proteína de ligação à cortactina por interação de dois híbridos (DU et al., 1998) e está intimamente associada com a face interna da membrana plasmática (KELLEY; SHAHAB; WEED, 2008). A expressão da proteína Shank2 e de suas isoformas

relacionadas é encontrada em células epiteliais, nas quais se ligam e regulam a manutenção de sódio e homeostase da água (HAN et al., 2006). Outro gene de interesse é o *PPFIA1*, também conhecido por Liprin a1, pertencente à família de proteínas que interagem com a tirosina fosfatase transmebrana relacionada ao antígeno leucocitário comum (LAR). O gene *PPFIA1* pode regular a perda de adesão focal e desta forma auxiliar nas interações célula-matriz. A adesão focal além de representar sítio de interação célula-matriz, funciona na ancoragem de fibras de estresse para a membrana plasmática e na transdução de sinal mediada por adesão (SERRA-PAGES et al., 1995).

Em carcinomas epidermóides de boca, o gene *SHANK2* está frequentemente co-amplificado e hiper-expresso com o gene *CTTN* (FREIER et al., 2006) e as suas proteínas interagem diretamente (DU et al., 1998). Sugere-se, assim, que *SHANK2* promove uma ligação molecular entre receptores transmenbrana e actina do citoesqueleto através da cortactina. Embora o significado funcional da hiper-expressão de *SHANK2* em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço não esteja elucidado, uma possível hipótese é que este gene possa participar do aumento da invasão celular dada a sua associação com a cortactina (OKAMOTO et al., 2001). Não existam evidências que mostrem a interação direta entre *PPFIA1* com *CTTN* e *SHANK2*, contudo as funções desses genes estão relacionadas nas interações célula-matriz. Além disso, esses três genes estão intimamente agrupados na porção distal da região 11q13, e diversos trabalhos vêm mostrando a desregulação desses genes em carcinomas de cabeça e pescoço (RODRIGO et al., 2000; JÄRVINEN et al., 2008; TAN et al., 2008), e especificamente de boca (HUANG et al., 2006; FREIER et al., 2006). Interessantemente, Huang et al. (2006) revelaram forte correlação dos níveis de transcritos do *PPFIA1*, *CTTN*, e *SHANK2* em linhagens

celulares de carcinoma epidermóide de boca, contribuindo possivelmente com o potencial invasivo deste tumor.

Ainda, há outro gene que foi recentemente descoberto por Huang et al. (2002), localizado na região cromossômica 11q13 designado *ORAOV1* (*Oral Cancer Overexpressed 1*), também conhecido como *TAOS1* (*Tumor Amplified and Overexpressed Sequence 1*). Este gene tem se destacado como alvo em análise quantitativa do seu número de cópias, a exemplo dos estudos em tumores primários da região de cabeça e pescoço desenvolvidos por Gibcus et al. (2007), e estudos em boca realizado por Huang et al. (2002) e Huang et al. (2006), em que o gene *TAOS1* foi identificado como amplificado e hiper-expresso em 63% das linhagens de carcinoma epidermóide de boca analisadas, existindo correlação entre a expressão gênica com a amplificação genômica.

Estudos realizados por Zhou et al. (2006) encontraram resultados clínicos bastante relevantes ao testar o poder preditivo de genes selecionados por *microarray* e validados por qRT-PCR para desenvolvimento de metástase nodal e disseminação extra-capsular de 25 amostras de carcinoma epidermóide de língua. A análise mostrou os melhores valores preditivos para *CTTN* e Metaloproteinase de matriz 9 (*MMP-9*), sendo que as combinações específicas de marcadores determinada por um modelo logístico foi *CTTN+MMP-9+EGFR* para metástase e *CTTN+EEF1A1+MMP-9* para disseminação extra-capsular.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases zinco-dependentes que representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação ou reabsorção dos componentes da matriz extracelular. São as principais responsáveis pelo remodelamento tecidual durante eventos fisiológicos

como a embriogênese e organogênese, bem como em eventos patológicos como a invasão tumoral nos tecidos. Mais de 20 MMPs já foram identificadas e, baseado em sua estrutura, substrato específico e localização celular, as MMPs são classificadas em colagenases, gelatinases, estromelisinas e tipo de membrana (DERYUGINA; QUIGLEY, 2006; LIOTTA; KOHN, 2002; OVERALL; LÓPEZ-ÓTIN, 2002). A MMP-7, também conhecida por matrilisina-1 ou PUMP-1, é o membro com a estrutura mais simples desta família, contendo apenas: (I) N-terminal pré-peptídico (cerca de 10 kDa), sinalizador da secreção e removido no retículo endoplasmático rugoso; (II) N-terminal pró-peptídico, removido intra ou extracelularmente (cerca de 80 aminoácidos, contendo a sequência conservada PRCXXPD) e (III) catalítico (20 kDa). Localiza-se no cromossomo 11q21-q22 (SNIJDERS et al., 2005) e diferentemente de outras MMPs, que são comumente expressas em células do estroma, a MMP-7 parece estar expressa predominantemente em células epiteliais do tecido glandular, e geralmente produzida em excesso em células de carcinoma em estágios precoces do desenvolvimento (YUAN et al., 2008).

A participação da *MMP-7* na carcinogênese tem sido relatada em diferentes tumores, dentre eles, em carcinoma epidermóide de boca, onde foi encontrada como hiper-expressa em relação ao tecido normal (SNIJDERS et al., 2005), em neoplasias da região de cabeça e pescoço (PACHECO et al., 2002), além de mama (HEPPNER et al., 1996), pulmão (BOLON et al., 1997), próstata (LYNCH et al., 2005), esôfago (YAMAMOTO et al., 1999), estômago (ADACHI et al., 1998), endométrio (GRAESSLIN et al., 2006), ovário (TANIMOTO et al., 1999) e cólon (SOREIDE et al., 2006). O estudo imuno-histoquímico da MMP-7 em carcinoma epidermóide de esôfago demonstrou valor preditivo desta enzima na sobrevida global e sobrevida livre de doença em análises multivariadas, sugerindo, assim, que a sua expressão

pode funcionar como poderosa ferramenta preditiva de recorrência e pior prognóstico (YAMAMOTO et al., 1999). Apesar de não localizar-se especificamente na região 11q13, o fragmento do cromossomo 11 em que se encontra o gene *MMP-7* apresenta-se amplificado no câncer de boca, enfatizando a importância da *MMP-7* juntamente com outros genes como *TLN1*, *LAMA3* e *CTTN* que participam de processo de adesão e migração celular (SNIJDERS et al., 2005).

Deste modo, objetivamos avaliar em carcinoma epidermóide de boca, através de qRT-PCR em tempo real, a expressão de quatro transcritos de genes localizados na região cromossômica 11q13, sendo eles *PPFIA1, CTTN, SHANK2*, que exibem funções relacionadas com interações célula-matriz, tentando associá-los com a expressão do gene *MMP-7*, componente efetivo de degradação de matriz, e que se localiza no mesmo cromossomo, com intuito de contribuir no entendimento do papel da expressão desses genes na carcinogênese de boca e validar os achados prévios obtidos por *microarray* vinculados ao Projeto Temático supracitado. Dentre os diversos genes diferencialmente expressos encontrados a partir destes referidos achados, os genes propostos no presente estudo pertencem a uma região cromossômica específica, e por isso ainda objetivamos demonstrar a expressão do gene *TAOS1*, que também se localiza na região cromossômica 11q13 e está provadamente alterado no carcinoma epidermóide de boca, tentando assim demonstrar se existe relevância da sua expressão concomitante aos demais genes propostos, ampliando o seu espectro de ação. A importância em se estabelecer relação com critérios definidos de agressividade dos tumores (sendo tumor menos agressivo classificados em T3 e T4 N0; e tumores mais agressivos em T1 e T2 N+) se faz necessária no sentido de propor este critério como uma ferramenta útil no intercâmbio com os achados moleculares.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo se propõe a analisar a expressão de transcritos dos genes *PPFIA1*, *CTTN*, *SHANK2, TAOS1* e *MMP-7* em amostras de carcinoma epidermóide de boca bem como de tecido não tumoral adjacente (margem), relacionando esses achados com dados clínicos e critérios de agressividade estabelecidos. Especificamente pretende-se atingir três objetivos:

a) Amplificar transcritos dos genes *PPFIA1*, *CTTN*, *SHANK2*, *TAOS1* e *MMP-7* utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real,

b) Relacionar a expressão dos transcritos em amostras de carcinoma epidermóide de boca com amostras do tecido não tumoral adjacente, e correspondente,

c) Relacionar os dados de expressão diferencial obtidos com aspectos clínicos e histopatológicos, com critérios de agressividade estabelecidos e com a sobrevida dos pacientes.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Critérios de seleção

Os critérios definidos para inclusão dos casos utilizados no presente estudo foram amostras com diagnóstico confirmado após exame anátomo-patológico da peça cirúrgica de carcinoma epidermóide de boca, de pacientes tabagistas com idade igual ou superior a 40 anos, de ambos os sexos, com lesões intra-bucais de língua bem como de assoalho bucal, e que representassem o sítio primário da lesão. Os casos foram selecionados ainda com base no sistema TMN, para que enquadrassem em dois grupos pré-estabelecidos, como 1) tumores mais agressivos: T1/T2, N+; e 2) tumores menos agressivos: T3/T4, N0, sem evidências de metástase ou infiltração. Todos os pacientes incluídos neste estudo foram submetidos à ressecção cirúrgica como tratamento de escolha, reservando-se os tratamentos quimio e radioterápico como adjuvantes ou paliativos.

Todos os pacientes assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” referente a cada instituição onde as amostras foram coletadas (Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Hospital Heliópolis), tendo sido previamente submetidos e aprovados pelo CONEP (parecer nº 1763/2005) (Anexo A). O presente estudo em particular foi autorizado pelo Comitê de Ética da FOUSP (protocolo nº 231/2008) (Anexo B).

As amostras coletadas foram armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer a -80ºC em seus respectivos centros de armazenamentos, permanecendo nesta condição até a posterior microdissecção e extração do RNA total.

4.2 Casuística e Dados dos pacientes

Foram utilizadas amostras originadas de tecidos congelados de 29 pacientes, correspondendo a 15 pacientes portadores de tumores classificados como menos agressivos e 14 como mais agressivos. As amostras de todos os casos mais agressivos foram pareadas tumor/margem. Já nos casos menos agressivos, 10 amostras de tumores e margens estavam pareadas, e o mesmo não foi possível em 4 amostras que não apresentavam a margem correspondente.

Os dados clínicos, histopatológicos e de acompanhamento referentes a cada paciente incluídos neste estudo (Apêndice A) foram obtidos a partir do sistema eletrônico do Projeto Temático GENCAPO (Genoma Clínico de Cabeça e Pescoço; http://ctc.fmrp.usp.br/clinicalgenomics/cp/; FAPESP 01/13717-3) sob responsabilidade do Prof. Dr. Victor Wünsch Filho, coordenador da Equipe de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Os dados clínicos obtidos incluíram idade, sexo e história de consumo de tabaco e álcool.

Os dados da peça cirúrgica incluíram localização e tamanho da lesão (pT), comprometimento linfonodal (pN), presença de metástase a distância (pM), diferenciação histológica (dif. histol.), infiltrações perineural (IP), vascular sanguínea

(IS) e vascular linfática (IL). Os dados de acompanhamento incluíram seguimento em meses (determinado entre a data da cirurgia e a data do óbito em consequência da neoplasia ou data da última informação de seguimento) e o desfecho clínico representado por ocorrência de óbito, recorrência local e surgimento de segundo tumor primário.

4.3 Obtenção do RNA total

As amostras biológicas de tecido congelado foram previamente emblocadas em *Tissue Teck* e coradas com azul de toluidina para microdissecção manual realizada pelos patologistas Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes e pela pesquisadora Drª Camila de Oliveira Rodini. Contaminantes teciduais, tais como glândula salivar, tecidos muscular e adiposo foram eliminados, selecionando-se, desta forma, apenas o tecido tumoral de interesse, representado em média por 70-80% do espécime remanescente, bem como as margens, representadas por tecido epitelial morfologicamente livre de tumor.

Em seguida, as amostras tumorais e não tumorais microdissecadas foram submetidas à extração de RNA total utilizando-se solução de TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), segundo recomendações do fabricante. A pureza do RNA extraído foi verificada através de leitura em espectrofotômetro NanoDrop™ cuja razão $A_{260/280}$ variou entre 1,3 e 1,9. A qualidade do RNA foi avaliada através de gel de integridade, sendo considerada ótima quando as bandas ribossômicas 28S e 18S apresentaram-se nítidas e intensas, numa razão aproximada de 2:1

respectivamente. Procedeu-se a etapa de tratamento com DNase I (Promega) para as amostras de RNA com qualidade considerada satisfatória ou boa.

A etapa de extração do RNA foi realizada no laboratório da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

4.4 Transcrição reversa

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa pela *MultiScribe*™ transcriptase reversa a partir de oligonucleotídeos randômicos (*High Capacity cDNA Archive kit*, Applied Biosystems, Foster City CA), para o volume final de reação de 50 μL utilizando-se 1,0 μg de RNA total. A mistura com todos os reagentes necessários para a reação foi preparada em fluxo laminar, e os tubos com as amostras foram colocados em termociclador (*Mastercycler*, Eppendorf) sendo submetidos a 25^{o}C por 10 min seguido de um período de incubação de 120 min a 37^{o}C.

A etapa de transcrição reversa foi realizada no Laboratório do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

4.5 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Com a finalidade de validar os achados de expressão gênica obtidos em análise prévia de *microarray* e também determinar a diferença de expressão de maneira mais precisa, foram feitos estudos de expressão através de qRT-PCR. Assim, a amplificação dos transcritos dos genes *PPFIA1*, *CTTN*, *SHANK2*, *TAOS1* e *MMP-7* foi avaliada por qRT-PCR, gerando dados quantitativos. O gene de expressão constitutiva *HPRT* foi utilizado para controle de normalização de massa. Todos os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram desenhados a partir da sequência de mRNA do gene em questão contidos no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide. Os iniciadores utilizados foram desenhados utilizando-se o programa Gene Tool 2.0 (Bio Tools Incorporated, Alberta, Canadá), de forma que as sequências estivessem presentes em éxons diferentes, apresentando uma temperatura de associação entre 58 e 62ºC e gerando produtos de tamanho idealmente entre 80 e 200pb (Tabela 4.1). Os produtos da transcrição reversa serviram de molde para a amplificação por qPCR.

O protocolo experimental utilizado no presente trabalho descreve o procedimento detalhado para qRT-PCR utilizando-se o fluoróforo SYBR Green Master Mix® (Applied Byosistems) realizado em termociclador ABI PRISM 7500. Todas as reações foram realizadas num volume final de 25 μL em tubos óticos com os seguintes reagentes: 1 μL de cada iniciador senso e anti-senso nas concentrações de 2,5 pmol/μL para o gene alvo *PPFIA1*, 5 pmol/μL para o gene alvo *CTTN* e 10 pmol/μL para os genes alvos *SHANK2*, *TAOS1* e *MMP-7*, 12,5 μL de SYBR® Green Mix (2x), 2 μL de cDNA (diluição de 1:5) e água estéril para completar

o volume final. O processo de ciclagem térmica constituiu-se de desnaturação inicial a 95ºC por 10 minutos, seguido de 40 ciclos constituídos por desnaturação a 95ºC por 15 segundos e associação/extensão a 60ºC por 1 minuto para os genes *CTTN* e *TAOS1*, 61ºC para o gene *PPFIA1*, e 62ºC para os genes *SHANK2* e *MMP-7*. Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à etapa adicional para realização da curva de dissociação para análise da especificidade através da cinética de dissociação dos produtos amplificados. Nessa etapa, aumenta-se a temperatura de forma linear e a fluorescência de cada amostra é representada graficamente. Todas as amostras experimentais foram amplificadas em triplicata técnica, e para cada par de iniciadores a reação de qPCR apresentava um controle de contaminação, onde se substitui o cDNA da amostra por água estéril.

Em seguida, os resultados da qRT-PCR foram analisados a partir do *software* 7500 v2.0 (Applied Byosistems), conferindo-se especificidade da reação na ausência de qualquer curva de dissociação bimodal ou sinal anormal de amplificação. A análise dos dados foi realizada através de quantificação relativa pelo Método do Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), utilizando o gene constitutivo *HPRT* para controle de normalização dos dados. Como amostra calibradora (amostra na qual todos os resultados obtidos foram comparados) foi utilizada a linhagem celular HN31 (linfonodo metastático de paciente com tumor em faringe). A expressão de cada gene específico foi comparada entre amostras tumoral e não tumoral, bem como entre os tumores mais e menos agressivos.

Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas no Laboratório de Patologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP.

Tabela 4.1 - Sequência e orientação dos iniciadores utilizados para amplificação por qRT-PCR, segundo o gene, número de acesso no Gene Bank, e tamanho do produto

GENE	NÚMERO DE ACESSSO	INICIADORES (5´3´)		TAMANHO DO PRODUTO (pb)
		SENSO	ANTI-SENSO	
PPFIA1	NM_003626.2	cttccaaagcagccattctc	cagatggaagcacagttgga	172
CTTN	NM_005231.3	gtggccgacagctgacttat	gcaccaggagcatatcaaca	163
SHANK2	NM_012309.1	tcgaggtacgatgcgaaggca	ccggcatggacaggcttctg	125
TAOS1	NM_153451.2	tgatggcggatgagaggtttc	ttccctccatcacacccaaac	81
MMP-7	NM_002423.3	gcgttcatcctcatcgaagt	tgtatggggaactgctgaca	151
HPRT	NM_000194.2	ttctttgctgacctgctgg	tcccctgttgactggtcat	119

4.6 Análise estatística

Para análise estatística dos dados foram obtidas distribuições absolutas e percentuais das variáveis nominais ou categóricas, e para as variáveis numéricas, medidas estatísticas tais como valor mínimo, valor máximo, média, mediana e desvio padrão foram utilizadas. Para viabilizar a análise estatística do estudo algumas categorias foram agrupadas como:

- Idade: agrupados em < 60 anos e ≥ 60 anos.

- Tabagismo: agrupados em “sim” e “no passado”

- Etilismo: agrupados em “sim” e “não/no passado”

Primeiramente, a análise univariada foi realizada como intuito de verificar a presença de associação entre as variáveis clínicas e a) ocorrência de óbito, b) recidiva e c) agressividade. Para tal, foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exato de Fisher, quando condições para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas. Estes testes avaliam diferenças entre dois grupos

independentes, em relação a uma variável qualitativa qualquer que só admita duas alternativas como resposta.

O teste não-paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparação de medidas de expressão gênica quantitativa em amostras pareadas (tumor e margem de maneira geral e conforme agressividade), por ser um teste que considera na análise a dependência de que são medidas em um mesmo indivíduo. Já para comparação das medidas quantitativas de expressão gênica entre os tumores mais e menos agressivos, bem como para avaliação das medidas quantitativas de expressão gênica nos grupos tumor e margem de acordo com as variáveis clínicas, foi aplicado o teste t-Student ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As variáveis clínicas testadas foram local, idade (abaixo de 60 ou igual/acima de 60 anos), fumo (sim ou no passado), diferenciação histológica (bem ou moderadamente diferenciados), infiltração linfática e infiltração perineural (presentes ou ausentes). Para a escolha do teste de comparação, a suposição de normalidade para as amostras segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov foi primeiramente testada. Quando os valores indicavam que as amostras possuíam uma distribuição normal, permitia a utilização do teste t, que analisa variâncias iguais ou desiguais, conforme resultados de verificação de hipótese de igualdade de variância. Para as demais amostras o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, que avalia se existe diferença estatística significante entre as médias dos postos de duas amostras independentes, foi aplicado devido à grande dispersão dos dados.

Na busca de possíveis marcadores de agressividade tumoral que consigam discriminar tumores mais e menos agressivos de acordo com a expressão do gene alvo foram construídas curvas ROC (Receiver-Operating Characteristic plots) para determinar pontos de corte a partir de medidas de sensibilidade e especificidade.

Esta curva é utilizada para avaliar o desempenho diagnóstico de um teste ou a sua precisão para discriminar casos normais de doentes. A probabilidade de um teste diagnóstico produzir um resultado positivo, dado que o indivíduo é portador da doença ou, no caso, que o tumor é mais agressivo, é chamada sensibilidade do teste; e a probabilidade do teste produzir um resultado negativo, dado que o indivíduo não porta a doença ou, no caso, que o tumor é menos agressivo, é chamada especificidade.

Na curva ROC, o eixo vertical é a função da fração verdadeiramente positiva (sensibilidade) e o eixo horizontal é em função da fração falsamente positiva (especificidade), para diferentes pontos de corte. Cada ponto da curva ROC representa o par sensibilidade/especificidade correspondente a um limiar particular. Quanto maior a área da curva, maior a precisão do teste (ZWEIG; CAMPBELL, 1993), sendo que a área abaixo da curva ROC (AUC) é um dos índices mais utilizados para verificar a “qualidade” da curva, estando associada ao poder discriminante desse teste. Quando se obtém um valor de AUC igual a 0,5 considera-se um desempenho ao acaso, enquanto um valor próximo de 1,0 indica uma predição quase perfeita. Assim, através da análise da AUC, foram obtidos pontos que fornecessem a probabilidade de que o teste classifique corretamente os tumores quanto à agressividade.

Com o intuito de avaliar o relacionamento entre algumas características clínicas dos indivíduos portadores de carcinoma epidermóide de boca, bem como a expressão de possíveis marcadores de agressividade tumoral com o evento morte, foi utilizado o método não paramétrico de Kaplan-Meier (ARMITAGE; BERRY, 1994), que permite a construção de curvas com as estimativas das probabilidades de sobrevivência em função do tempo de duração entre a data da cirurgia e a data do

óbito ou do último acompanhamento de observação, considerando-se apenas o desfecho óbito relacionado à neoplasia. Assim, a evolução durante todo o período de seguimento do indivíduo é considerado e não só os resultados finais. As curvas com as estimativas das probabilidades de sobrevivência em função do tempo de observação elaboradas utilizando-se o estimador produto-limite de Kaplan-Meier são construídas de forma que as estimativas calculadas independem da condição do paciente, isto é, não são consideradas as outras informações como sexo, idade, etc. Para avaliar a influência dessas variáveis, as curvas de Kaplan-Meier foram construídas para as categorias de cada variável qualitativa e para a comparação das curvas foi utilizado o teste de *Log-Rank* (ARMITAGE; BERRY, 1994). Foram estimadas as probabilidades de sobrevida para as variáveis idade, tabagismo, sítio anatômico, bem como tipo de tumor (mais e menos agressivo) e pontos de corte das curvas ROC dos genes que apresentaram valor de AUC acima de 0,5. A estatística deste teste é a diferença entre o número observado em cada grupo e uma quantidade que, para muitos propósitos, pode ser interpretada como o correspondente número esperado de falhas sob a hipótese nula (COLOSIMO; GIOLO, 2006). Neste tipo de análise, para cada variável é realizado um teste de significância que indica se a variável em questão influencia ou não a resposta de interesse (óbito).

O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, quando o valor de p do teste estatístico foi menor ou igual a 0,05 existiu significância estatística. O *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Science*, SPSS Inc, Chicago EUA) versão 12.0 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos casos

A frequência dada em número e valor percentual das informações clínicas, anátomo-patológicas e do desfecho clínico dos 29 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca incluídos no estudo estão sumariadas na Tabela 5.1. A análise descritiva da amostra demonstrou que a população do estudo apresentou uma média etária calculada em 52,79 anos, cujo desvio padrão foi de 8,18, a idade mínima 40 anos e a idade máxima 75 anos. Agrupando-se por faixa etária abaixo e acima de 60 anos, foi observada uma distribuição percentual de 79,3% (n=23) de casos ≤ 60 anos, e de 20,7% (n=6) > 60 anos. Esta população estava representada ainda na sua maioria por indivíduos do sexo masculino (93,1%, n=27), fumantes ativos (79,3%, n=23) ou que fumaram no passado (20,7%, n=6) e etilistas (82,8%, n=24).

Considerando os sítios anatômicos envolvidos, o assoalho (62,1%, n=18) exibiu uma maior prevalência em relação à língua (37,9%, n=11). Quanto à extensão anatômica do tumor primário, tumores classificados como T1 corresponderam a 10,4% (n=3), como T2 37,9% (n= 11), já tumores T3 representaram 34,5% (n=10), e T4 17,2% (n=5). Observou-se ocorrência de metástases em linfonodos cervicais em 51,7% (n= 15) dos casos (N+), e 48,3% (n=14) não exibiram este comprometimento (N0). Ainda, nenhum caso apresentou ocorrência de metástases a distância (M).

Em relação aos aspectos anátomo-patológicos, no que se refere à diferenciação histopatológica, apenas casos graduados como bem diferenciados (58,6%, n=17) e moderadamente diferenciados (41,4%, n=12) constituíram a casuística. Quanto à infiltração vascular sanguínea, vascular linfática, e perineural mostraram-se presentes em 6,9% (n=2), 27,6% (n=8) e 51,7% (n=15) dos casos respectivamente.

O seguimento dos pacientes envolveu um tempo médio de 31 meses (DP=19,84), com o período mínimo de 5 meses e o máximo de 67 meses, sendo estabelecida a data da cirurgia como início do seguimento até a data do último acompanhamento ou óbito, sendo que em relação a este evento, 11 (37,93%) mortes tiveram como causa o tumor e apenas 1 caso devido outras causas que não o câncer. Informações sobre recorrência (20,68%, n=6) e ocorrência de segundo tumor primário (10,4%, n=3) também foram eventos considerados no desfecho clínico dos pacientes.

Tabela 5.1 - Número e distribuição percentual das informações clínicas, anátomo-patológicas e do desfecho clínico dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca

Variável	Categoria	Número	%
Idade	< 60 Anos	23	79,3
	≥ 60 Anos	6	20,7
Sexo	Masculino	27	93,1
	Feminino	2	6,9
Tabagismo	Sim	23	79,3
	No passado	6	20,7
Etilismo	Sim	24	82,8
	Não/no passado	5	17,2
Local	Língua	11	37,9
	Assoalho	18	62,1
T	T1	3	10,4
	T2	11	37,9
	T3	10	34,5
	T4	5	17,2
N	N0	14	48,3
	N+	15	51,7
M	M0	29	100
	M+	0	0
Diferenciação histológica	BD	12	41,4
	MD	17	58,6
Infiltração sanguínea	Ausente	27	93,1
	Presente	2	6,9
Infiltração linfática	Ausente	21	72,4
	Presente	8	27,6
Infiltração perineural	Ausente	14	48,3
	Presente	15	51,7
Desfecho clínico	Recorrência local	6	20,7
	2º tumor primário	3	10,4
	Óbito*	11	37,9
Total		29	100

*Óbito em decorrência da neoplasia

5.1.1 Associação das variáveis clínicas e anátomo-patológicas com agressividade tumoral

A partir da análise dos dados qualitativos, o teste Qui-quadrado, ou Exato de Fisher quando aplicável demonstrou que não foram encontradas evidências estatísticas de que exista uma associação entre a agressividade tumoral e as variáveis clínicas como idade (p=0.99, Exato de Fisher), sexo (p=0,22, Exato de Fisher), local (p=0,597, Qui-quadrado), tabagismo (p=0,39, Exato de Fisher) e etilismo (p=0,168, Exato de Fisher); e anátomo-patológicas como diferenciação histológica (p=0,876, Qui-quadrado), infiltração sanguínea (p=0,99, Exato de Fisher), linfática (p=0,34, Exato de Fisher) e perineural (p=0,096, Qui-quadrado). A tabela 5.2 exibe a distribuição dos dados em relação à agressividade tumoral com os respectivos valores de p desta associação.

Em relação à localização (língua e assoalho), vale ressaltar que não houve diferença estatística significante por ter existido uma distribuição equilibrada de ambos os sítios em relação ao critério de agressividade, sendo os tumores menos agressivos representados por 57,1% dos casos acometendo assoalho (n=8) e 42,9% dos casos em língua (n=6), e os tumores mais agressivos representados por 66,7% dos casos ocorrendo em assoalho (n=10) e 33,3% dos casos em língua (n=5).

Quanto à presença de infiltração perineural existem fracas evidências de associação com agressividade, exibindo um maior percentual de casos menos agressivos (66,7%, n=10) que apresentavam este tipo de infiltração, em contraste a

tumores mais agressivos nos quais foi observado um maior percentual de casos (64,3%, n=9) que não exibiram infiltração perineural.

Tabela 5.2 - Número e distribuição percentual das informações clínicas, anátomo-patológicas em relação à agressividade tumoral dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca

Variável	Categoria	Agressividade		p
		Menos n(%)	Mais (%)	
Idade	< 60 Anos	12 (80)	11 (78,6)	0,99
	≥ 60 Anos	3 (20)	3 (21,4)	
Sexo	Masculino	0 (0)	2 (14,3)	0,22
	Feminino	15 (100)	12 (85,7)	
Tabagismo	Sim	2 (13,3)	4 (28,6)	0,39
	No passado	13 (86,7)	10 (71,4)	
Etilismo	Sim	14	10	0,168
	Não/no passado	1	4	
Local	Língua	5 (33,3)	6 (42,9)	0,597
	Assoalho	10 (66,7)	8 (57,1)	
Grau de diferenciação	BD	6 (40)	6 (42,9)	0,39
	MD	9 (60)	8 (57,1)	
Infiltração sanguínea	Ausente	14 (93,3)	13 (92,9)	0,99
	Presente	1 (6,7)	1 (7,1)	
Infiltração linfática	Ausente	12 (80)	9 (64,3)	0,34
	Presente	3 (20)	5 (35,7)	
Infiltração perineural	Ausente	5 (33,3)	9 (64,3)	0,096
	Presente	10 (66,7)	5 (35,7)	

*Significância estabelecida com p < 0,05

5.1.2 Associação entre as variáveis clínicas e anátomo-patológicas com recorrência

Com a análise dos dados qualitativos, utilizando o teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher quando aplicável, não foi encontrada evidências estatísticas de que exista uma associação entre a maioria das variáveis clínicas e anátomo-patológicas estudadas e a recorrência do tumor como demonstrado na Tabela 5.3. Apenas a variável presença de infiltração perineural apresentou fracas evidências para uma associação inversa com a ausência de recorrência tumoral, uma vez que dos 15 casos que exibiram infiltração perineural, apenas um caso de recorrência foi observada (p=0,08, Exato de Fisher).

Tabela 5.3 - Número e distribuição percentual das informações clínicas, anátomo-patológicas em relação à recorrência tumoral dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca

Variável	Categoria	N(%)	Recorrência		P
			Não n(%)	Sim n(%)	
Idade	< 60 Anos	23 (79,3)	19 (82,6)	4 (66,7)	0,57
	≥ 60 Anos	6 (20,7)	4 (17,4)	2 (33,3)	
Sexo	Masculino	27 (93,1)	22 (94,7)	5 (83,3)	0,37
	Feminino	2 (6,9)	1 (4,3)	1 (16,7)	
Tabagismo	Sim	23 (79,3)	18 (78,3)	5 (83,3)	0,99
	No passado	6 (20,7)	5 (21,7)	1 (16,7)	
Etilismo	Sim	24 (82,8)	4 (80)	19 (79,17)	1
	Não/no passado	5 (17,2)	1 (20)	5 (20,83)	
Local	Língua	11 (37,9)	8 (34,8)	3 (50)	0,65
	Assoalho	18 (62,1)	15 (65,2)	3 (50)	
Agressividade	Menos	15 (51,7)	13 (56,5)	2 (33,3)	0,39
	Mais	14 (48,3)	10 (43,5)	4 (66,7)	
Grau de diferenciação	BD	(12) 41,4	8 (34,8)	4 (66,7)	0,19
	MD	(17) 58,6	15 (65,2)	2 (33,3)	
Infiltração sanguínea	Ausente	(27) 93,1	21 (91,3)	6 (100)	0,99
	Presente	(2) 6,9	2 (8,7)	0 (0)	
Infiltração linfática	Ausente	(21) 72,4	16 (69,6)	5 (83,3)	0,64
	Presente	(8) 27,6	7 (30,4)	1 (16,7)	
Infiltração perineural	Ausente	(14) 48,3	9 (39,1)	5 (83,3)	0,08
	Presente	(15) 51,7	14 (60,9)	1 (16,7)	

*Significância estabelecida com $p < 0,05$

5.1.3 Associação entre as variáveis clínicas e anátomo-patológicas com ocorrência de óbito

A análise dos dados qualitativos, com o teste Qui-quadrado, ou Exato de Fisher quando aplicável demonstrou que não foram encontradas evidências estatísticas de que exista uma associação entre as variáveis clínicas e anátomo-patológicas e a ocorrência de óbito. A Tabela 5.4 exibe a distribuição desses dados em relação aos respectivos valores de p desta associação.

Tabela 5.4 - Número e distribuição percentual das informações clínicas, anátomo-patológicas em relação à ocorrência de óbito dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca

Variável	Categoria	N(%)	Óbito		p
			Não n(%)	Sim n(%)	
Idade	< 60 Anos	23 (79,3)	13 (76,5)	10 (83,3)	1
	≥ 60 Anos	6 (20,7)	4 (23,5)	2 (16,7)	
Sexo	Masculino	27 (93,1)	17 (100)	10 (83,3)	0,16
	Feminino	2 (6,9)	0 (0)	2 (16,7)	
Tabagismo	Sim	23 (79,3)	14 (82,4)	9 (75)	0,66
	No passado	6 (20,7)	3 (17,6)	3 (25)	
Etilismo	Sim	24 (82,8)	14 (82,4)	10 (83,3)	1
	Não/no passado	5 (17,2)	3 (17,6)	2 (16,7)	
Local	Língua	11 (37,9)	5 (29,4)	6 (50)	0,43
	Assoalho	18 (62,1)	12 (70,6)	6 (50)	
Agressividade	Menos	15 (51,7)	11 (64,7)	4 (33,3)	0,13
	Mais	14 (48,3)	6 (35,3)	8 (66,7)	
Grau de diferenciação	BD	(12) 41,4	6 (35,3)	6 (50)	0,47
	MD	(17) 58,6	11 (64,7)	6 (50)	
Infiltração sanguínea	Ausente	(27) 93,1	15 (88,2)	12 (100)	0,49
	Presente	(2) 6,9	2 (11,8)	0 (0)	
Infiltração linfática	Ausente	(21) 72,4	11 (64,7)	10 (83,3)	0,4
	Presente	(8) 27,6	6 (35,3)	2 (16,7)	
Infiltração perineural	Ausente	(14) 48,3	8 (47,1)	6 (50)	0,99
	Presente	(15) 51,7	9 (52,9)	6 (50)	

*Significância estabelecida com p < 0,05

5.2 Análise da Expressão gênica

A expressão dos cinco genes alvos, *CTTN*, *MMP-7*, *PPFIA1*, *SHANK2* e *TAOS1* foi avaliada através de qRT-PCR nas 29 amostras de tecido tumoral e nas 25 amostras de tecido morfologicamente sadio correspondente a margens cirúrgicas. Todas as amostras do estudo mostraram amplificação para o gene constitutivo *HPRT*, utilizado como gene constitutivo. Em alguns casos, foi observado um pico secundário discreto abaixo da temperatura de dissociação dos fragmentos amplificados, referindo-se a dímeros de *primer*, como comprovado pelo controle negativo das reações. Para fins de quantificação, foram consideradas apenas amostras com pico de dissociação específico (pico único).

5.2.1 Distribuição das medidas de expressão dos genes estudados

A análise descritiva dos dados quantitativos demonstraram que amostras tumorais exibiram maiores médias de expressão para os genes *MMP-7* (Média=55,46; DP=96,49) e *SHANK2* (Média=8,43; DP=14,23), seguido dos genes *TAOS1* (Média=4,75; DP=7,69), *PPFIA1* (2,71; DP=2,97) e *CTTN* (Média=2,26; DP=1,99), respectivamente. O alto desvio padrão encontrado para os genes *MMP-7* e *SHANK2* se deve não só a variação na expressão em decorrência a presença de

outliers (valores extremos), mas também devido à existência de tumores que não exibiram expressão gênica para os mesmos (uma ocorrência em cada gene).

Nas amostras de margens, os genes *MMP-7* (Média=19,39; DP=36,42) e *SHANK2* (Média=6,40; DP=15,81), mantiveram as maiores médias de expressão, seguido dos genes *TAOS1* (Média=3,07; DP=1,77), *CTTN* (Média=1,94; DP=1,12) e *PPFIA1* (1,83; DP=1,51), respectivamente. O alto desvio padrão encontrado para os genes *MMP-7* e *SHANK2* se deve não só a variação na expressão em decorrência a presença de *outliers*, mas principalmente devido à existência de margens que não exibiram expressão gênica para os mesmos (8 ocorrências para o gene *MMP-7* e duas ocorrências para o gene *SHANK2*).

Os gráficos 5.1 e 5.2 tipo Boxplot mostram a distribuição de todos os valores entre as barras (percentis 25%, 50% e 75% dentro da caixa), exceto valores extremos (• = valores que ultrapassam 1,5-3,0 vezes a dimensão da caixa além o percentil 75%; * = valores que ultrapassam 3,0 vezes a dimensão da caixa além o percentil 75%) das medianas de expressão para amostras de tumores e margens respectivamente.

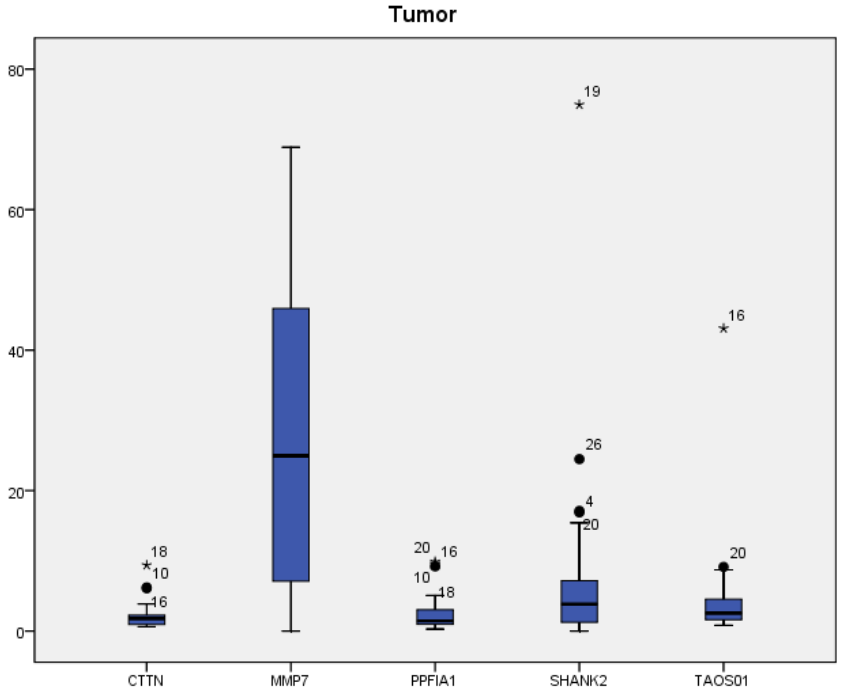


Gráfico 5.1 – Distribuição dos valores das medianas de expressão dos genes alvos *CTTN*, *MMP-7*, *PPFIA1*, *SHANK2* e *TAOS1* em amostras de tecido tumoral

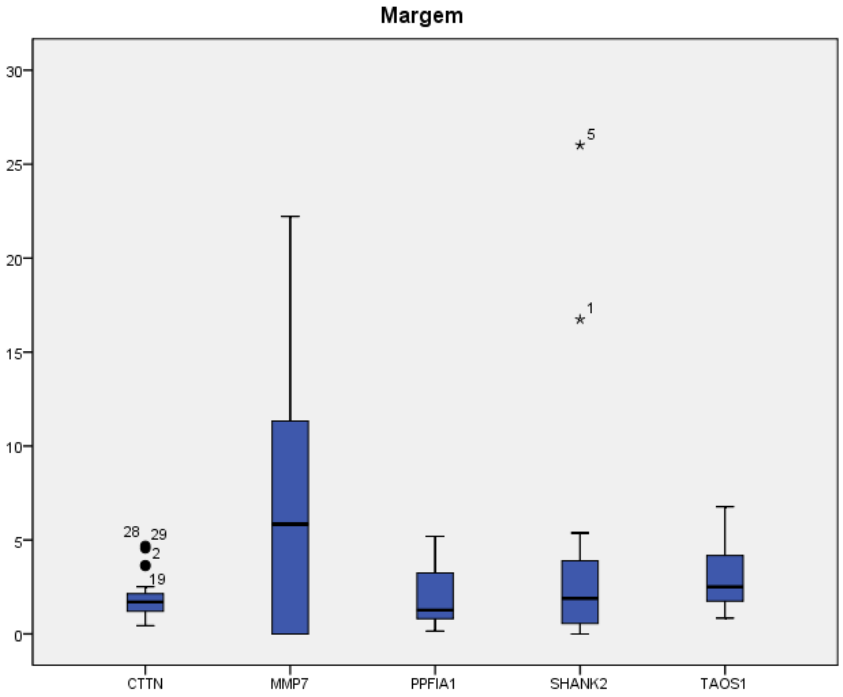


Gráfico 5.2 – Distribuição dos valores das medianas de expressão dos genes alvos *CTTN*, *MMP-7*, *PPFIA1*, *SHANK2* e *TAOS1* em amostras de margens

5.2.2 Comparação das medidas de expressão em Tumor e Margem para os genes estudados.

Na comparação das medidas de expressão dos genes estudados nos dois grupos definidos como tumor e margem, observou-se maiores valores de expressão nos tumores, em relação às margens, para todos os genes-alvo do estudo, porém apenas o gene *MMP-7* apresentou diferença estatisticamente significante (p= 0,003, Wilcoxon) nos níveis de expressão, conforme demonstrado na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Comparação das medidas da expressão dos genes alvos *CTTN*, *MMP-7*, *PPFIA1*, *SHANK2* e *TAOS1* segundo dois grupos definidos como tumor e margem. Teste não paramétrico Wilcoxon

Gene Alvo	Tumor média (DP)	Margem média (DP)	p
CTTN	2,26 (1,99)	1,94 (1,12)	0,860
MMP-7	55,46 (96,49)	19,39 (36,42)	0,003*
PPFIA1	2,71 (2,97)	1,83 (1,51)	0,135
SHANK2	8,43 (14,23)	6,40 (15,81)	0,143
TAOS1	4,75 (7,69)	3,07 (1,77)	0,166

*Significância estabelecida com p < 0,05

5.2.3 Comparação das medidas de expressão nos grupos de Tumores mais e menos agressivos para os genes estudados.

Ao comparar a expressão dos cinco genes-alvo conforme agressividade nos dois grupos definido como tumores mais e menos agressivos, o teste não paramétrico de Mann-Whitney ou o teste t-student, quando as amostras provinham de uma distribuição normal, não revelaram diferença estatística entre os grupos no nível de significância estabelecido (Tabela 5.6). O gene *MMP-7* mostrou fracas evidências de associação com tumores menos agressivos (p=0,29; Mann Whitney), enquanto todos os outros genes apresentaram maiores valores de expressão em tumores mais agressivos (Tabela 5.6).

Já na análise pareada, a comparação dos tumores menos agressivos em relação a suas respectivas margens, apenas o gene *MMP-7* apresentou diferença estatisticamente significante (p=0,015; Wilcoxon). Esta diferença não foi encontrada nos tumores mais agressivos em relação a suas respectivas margens para nenhum gene do estudo. A Tabela 5.7 exibe de forma resumida as comparações das medidas da expressão segundo os grupos mais e menos agressivos em relação a suas margens correspondentes, bem como os respectivos valores de p desta associação. O gráfico 5.3 ilustra a distribuição dos valores de expressão de cada gene, de acordo com os grupos de tumores mais e menos agressivos, bem como nas suas margens correspondentes.

Tabela 5.6 - Comparação das medidas da expressão dos genes alvos segundo dois grupos definidos como tumores mais e menos agressivos. Teste t-student (*CTTN* e *SHANK2*); Mann Whitney (*MMP-7*, *PPFIA1* e *TAOS1*)

Gene Alvo	Tumor menos agressivo	Tumor mais agressivo	p
CTTN	1,94	2,61	0,38
MMP-7	16,67	13,21	0,29
PPFIA1	12,67	17,5	0,13
SHANK2	6,26	10,76	0,46
TAOS1	12,73	13,4	0,84

*Significância estabelecida com p < 0,05

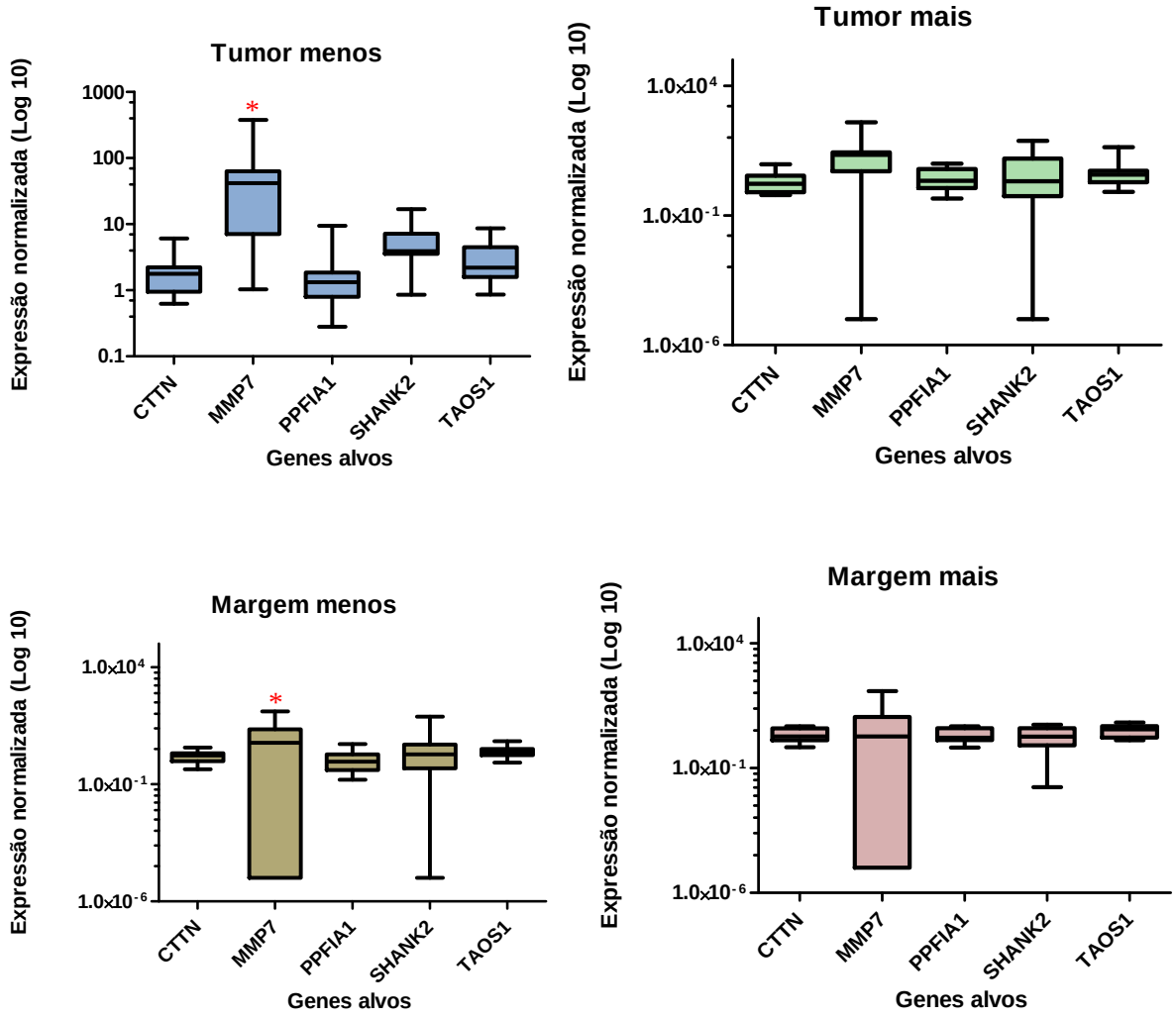
Tabela 5.7 - Comparação das medidas da expressão dos genes alvos *CTTN*, *MMP-7*, *PPFIA1*, *SHANK2* e *TAOS1* nos grupos de tumores mais e menos agressivos em relação a suas margens correspondentes. Teste não paramétrico Wilcoxon

Gene Alvo	Tu menos x Ma menos *mean rank*	p	Tu mais x Ma mais *mean rank*	p
CTTN	8,71 x 7,38	0,950	7,75 x 4,00	0,721
MMP-7	7,92 x 8,50	0,015*	5,62 x 5,00	0,074
PPFIA1	7,09 x 10,50	0,300	6,83 x 3,50	0,164
SHANK2	7,60 x 8,80	0,363	6,00 x 4,75	0,386
TAOS1	7,30 x 9,40	0,460	7,42 x 3,60	0,330

*Significância estabelecida com p < 0,05

Tu menos = tumor menos agressivo, Ma menos= margem de tumor menos agressivo;

Tu mais= tumor mais agressivo, Ma mais= margem de tumor mais agressivo



***** indica diferença estatisticamente significativa no tumor menos agressivo em relação à margem correspondente

Gráfico 5.3 - Gráficos da distribuição dos valores de expressão de cada gene, de acordo com os grupos de tumores mais e menos agressivos, bem como nas suas margens correspondentes

5.2.4 Associação das medidas de expressão dos genes-alvo com as variáveis clínicas e histopatológicas

Com intuito de relacionar os dados de expressão gênica com as variáveis clínicas e histopatológicas de interesse, aplicou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney ou o teste t-student quando as amostras assumiram normalidade, utilizando para a análise as variáveis local, idade, hábito de fumar, diferenciação histológica e infiltração perineural e os valores de expressão gênica nos tumores e nas margens. Foi observado maior nível de expressão do gene *PPFIA1* nos tumores localizados em assoalho em relação aos tumores de língua, com diferença estatisticamente significante (3,538 e 1,359 respectivamente; p=0,05; t-student). Ainda, existiu uma tendência de associação dos gene *PPFIA1*, *CTTN* e *TAOS1* com tumores bem diferenciados (p=0,09, p=0,08 e p=0,14 respectivamente; t-student) (Tabela 5.8). Não foi encontrada associação da expressão dos outros genes com as variáveis propostas ao se aplicar o nível de significância estabelecido (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 - Resultado dos testes Mann-Whitney e t-student para associação da expressão dos 5 genes alvos em tumores com os dados clínicos e histopatológicos

Variável	CTTN (p)	MMP-7 (p)	PPFIA1 (p)	SHANK2 (p)	TAOS1 (p)
Idade	0,27	0,95	0,28	0,91	0,419
Tabagismo	0,66	0,05	0,55	0,38	0,957
Local	0,27	0,9	0,05*	0,38	0,332
Grau de diferenciação	0,08	0,72	0,09	0,50	0,140
Infiltração linfática	0,25	0,25	0,21	0,19	0,266
Infiltração perineural	0,14	0,20	0,25	0,25	0,160

*Significância estabelecida com p < 0,05

5.3 Definição dos pontos de corte de agressividade da curva ROC

Na tentativa de classificar os tumores em grupos com a finalidade diagnóstica de indicar a presença ou a ausência de agressividade, admitindo-se uma determinada chance de erro, procedeu-se a realização da curva ROC. A tabela 5.9 descreve os valores de corte para agressividade, estabelecidos para cada gene a partir de medidas de sensibilidade e especificidade. A maior especificidade em relação à maior sensibilidade possível refere-se ao ponto de corte para o critério diagnóstico. Somente os genes *PPFIA1* e *TAOS1* apresentaram área sob a curva ROC estatisticamente significante, permitindo distinguir os grupos, e sendo assim selecionados para a análise de sobrevida aplicando seus respectivos pontos de corte.

Tabela 5.9 - Análise da curva ROC na definição de pontos de corte para agressividade

Gene Alvo	PC Agressividade	Sensibilidade	Especificidade	AUC	p
CTTN	> 1,95	0,50	0,40	0,519	> 0,05
MMP-7	> 15,60	0,71	0,60	0,381	> 0,05
PPFIA1	> 1,40	0,64	0,40	0,667	< 0,05*
SHANK2	> 5,71	0,42	0,40	0,386	> 0,05
TAOS1	> 2,96	0,64	0,33	0,60	< 0,05*

*Significância estabelecida com p < 0,05

PC= ponto de corte, **AUC=** área abaixo da curva ROC

5.4 Análise de sobrevida

O tempo de seguimento dos pacientes foi calculado em dias para a análise de sobrevida, variando de 156 a 2120 dias. Ao final deste período, 11 pacientes morreram em consequência da neoplasia, um paciente (8,4%) teve a causa de óbito foi edema pulmonar, e 17 pacientes não tiveram o óbito registrado e foram considerados como dados de censura. Inicialmente, foi calculado o tempo mediano de sobrevivência de todos os indivíduos que foi de 1360 dias Para análise de sobrevida global dos pacientes avaliados no estudo, foi utilizado o método do produto limite de Kaplan-Meier. A princípio foi desenhado o gráfico de sobrevida global, conforme o Gráfico 5.4.

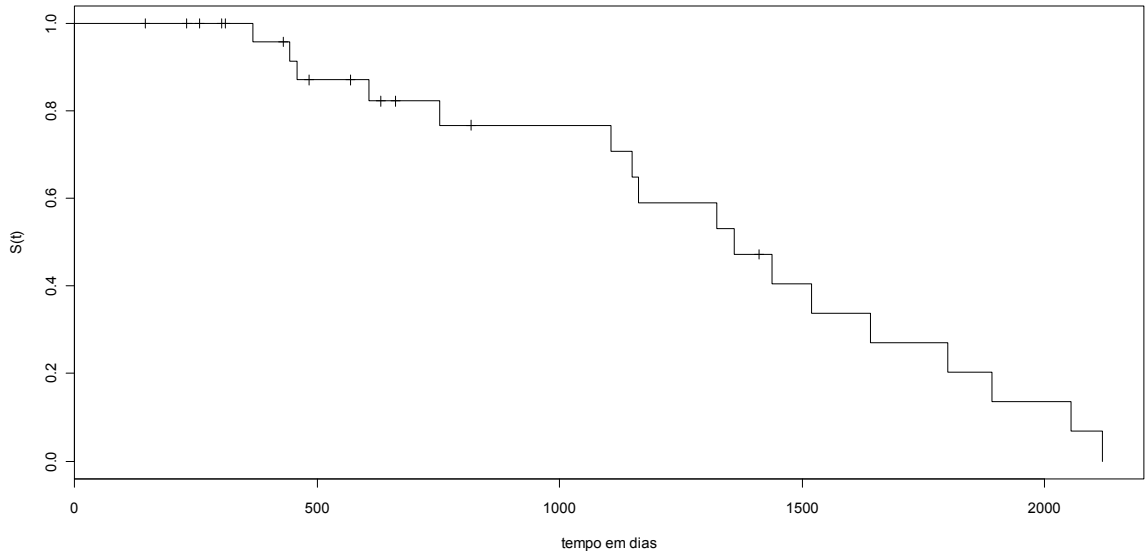


Gráfico 5.4 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para os 29 indivíduos avaliados

5.4.1 Correlação com variáveis clínicas e expressão dos genes *PPFIA1* e *TAOS1*

Para avaliar a influência de covariáveis, foram construídas curvas de Kaplan-Meier para as categorias de cada variável qualitativa (gráficos 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8). Através das curvas foi possível comparar, pelo teste do *log-Rank*, os pacientes de acordo as variáveis clínicas como idade, local, tabagismo, etilismo, em relação ao nível de expressão dos genes *PPFIA1* e *TAOS1* a partir dos pontos de corte estabelecidos pela análise da curva ROC. Os resultados do teste do *log-rank* de todas as variáveis analisadas em relação à sobrevivência média estão apresentados na tabela 5.10. Considerando a ausência de significância estatística no teste de *log-rank* aplicado às curvas de Kaplan-Meier, assim como o pequeno número de óbitos, não foi realizada a análise múltipla pelo modelo de Cox.

Tabela 5.10 - Sobrevivência média categorizada e teste do *log-rank* para cada um das variáveis avaliadas

Variável	Categoria	Sobrevivência média	*Log-Rank* (p)
Idade	< 60 Anos	1438	0,84
	≥ 60 Anos	1163	
Tabagismo	No passado	1438	0,32
	Sim	1324	
Etilismo	No passado	2054	0,02*
	Sim	1163	
Local	Língua	1438	0,7
	Assoalho	1360	
PPFIA1	< 1,4	1430	0,86
	≥ 1,4	1105	
TAOS1	< 2,9	1324	0,97
	≥ 2,9	1360	

*Significância estabelecida com p < 0,05

A faixa etária dos pacientes não influenciou de forma significativa a sobrevida global, uma vez que a curva de Kaplan-Meier mostrou fracas evidências de maior sobrevida para o grupo de pacientes com idade menor que 60 anos e consequentemente menor risco de óbito para esse grupo em relação ao grupo com idade superior ou igual à 60 anos (p=0,86; *log-rank*; Gráfico 5.5). Quanto ao local primário do tumor, não foi observada diferença na sobrevida dos pacientes com tumores em língua ou assoalho (p=0,7; *log-rank*; Gráfico 5.6). Não houve ainda correlação significativa entre o tabagismo e a sobrevida global dos pacientes (p=0,32; *log-rank*; Gráfico 5.7). Já em relação ao etilismo, observou-se que pacientes que deixaram o hábito de beber e relataram apenas este costume no passado tiveram uma melhor sobrevida do que os pacientes que ainda bebem (p=0,02; *log-rank*; Gráfico 5.8).

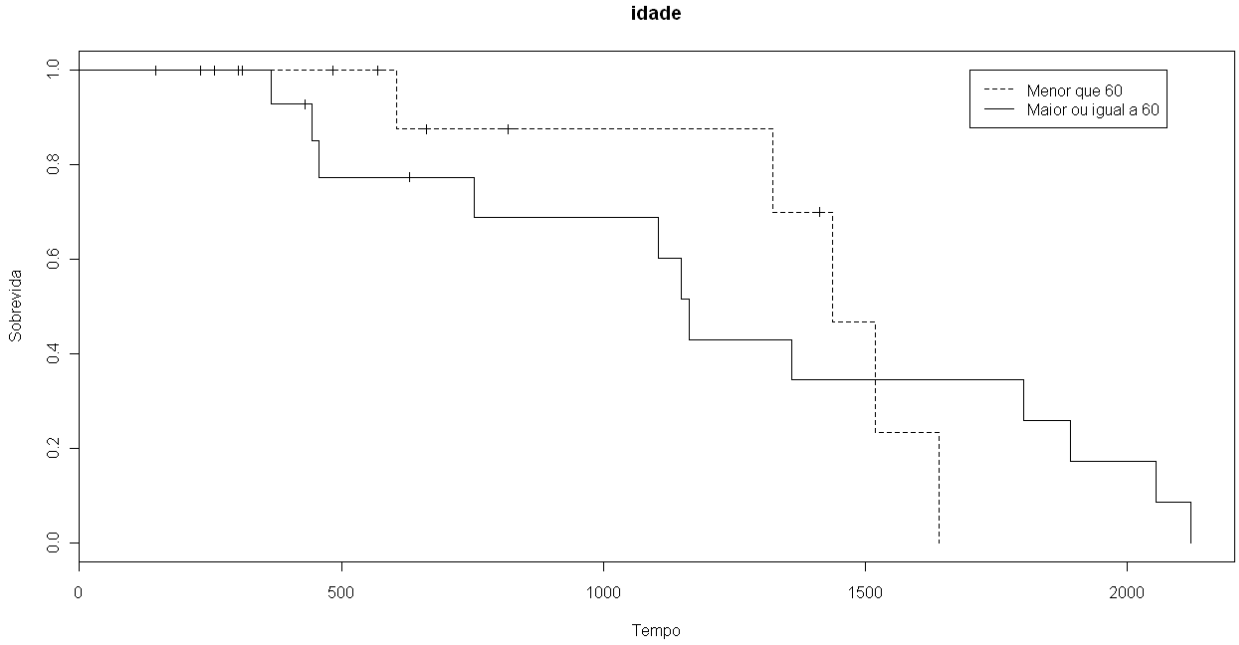


Gráfico 5.5 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos com idade menor que 60 anos e indivíduos com idade maior ou igual a 60 anos obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo

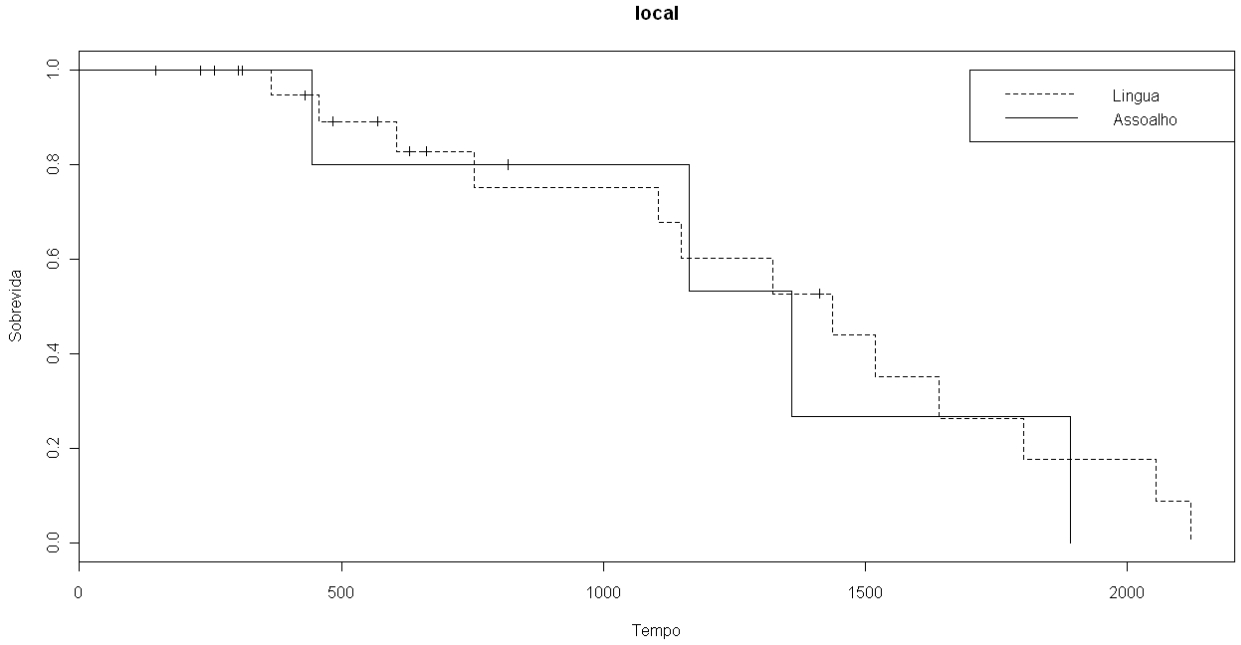


Gráfico 5.6 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para tumores localizados em língua e em assoalho obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo

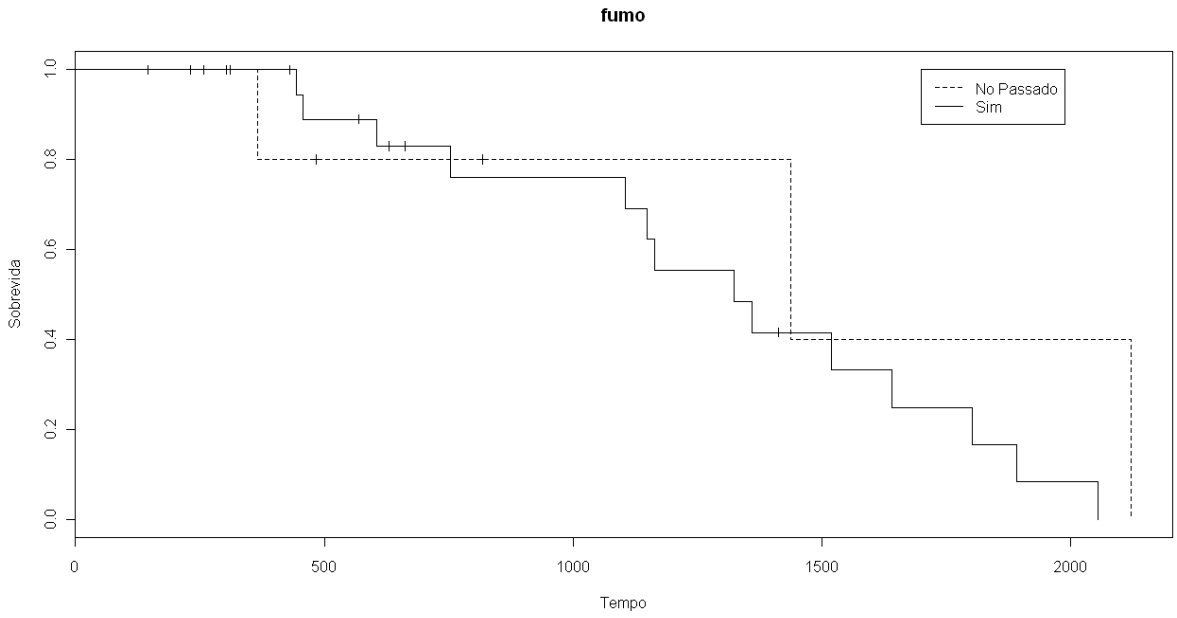


Gráfico 5.7 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos tabagistas e que fumaram no passado obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo

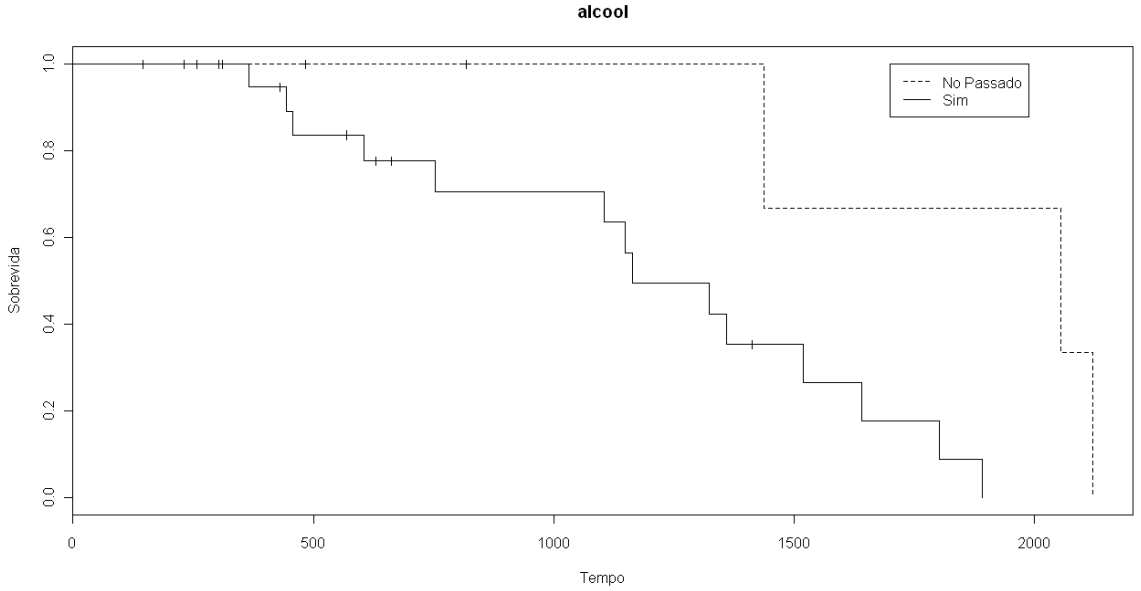


Gráfico 5.8 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para indivíduos etilistas e que beberam no passado obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo

Apesar de não observada significância estatística no teste *log-Rank* (p=0,85) da sobrevida em relação aos níveis de expressão do gene *PPFIA1*, aplicando-se ponto de corte de agressividade obtido pela curva ROC, existiu uma tendência de pacientes com tumores menos agressivos viverem mais quando apresentaram baixos níveis de expressão do gene *PPFIA1* (< 1,4), bem como de pacientes com tumores mais agressivos viverem menos quando quando apresentaram níveis elevados de expressão do gene *PPFIA1* (≥ 1,4). O mesmo pode ser observado para o gene *TAOS1* em que tumores mais agressivos exibiram fracas evidências de maior risco de óbito ao apresentarem valores de expressão superior ou igual a 2,9, enquanto que tumores menos agressivos demonstraram melhor sobrevivência ao exibirem valores de expressão inferior a 2,9 (p=0,97). As curvas de Kaplan-Meier para essas variáveis de expressão em relação à sobrevida dos pacientes estão apresentadas nos gráficos 5.9 e 5.10.

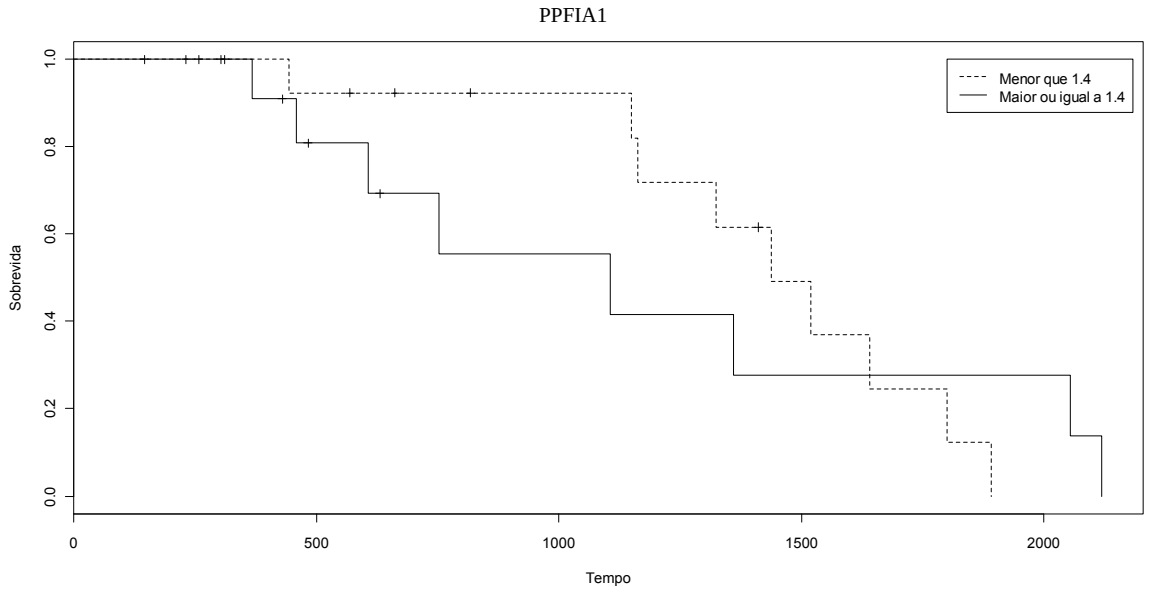


Gráfico 5.9 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier tumores com expressão acima ou abaixo do ponto de corte da expressão de *PPFIA1* para diagnóstico de agressividade, obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo

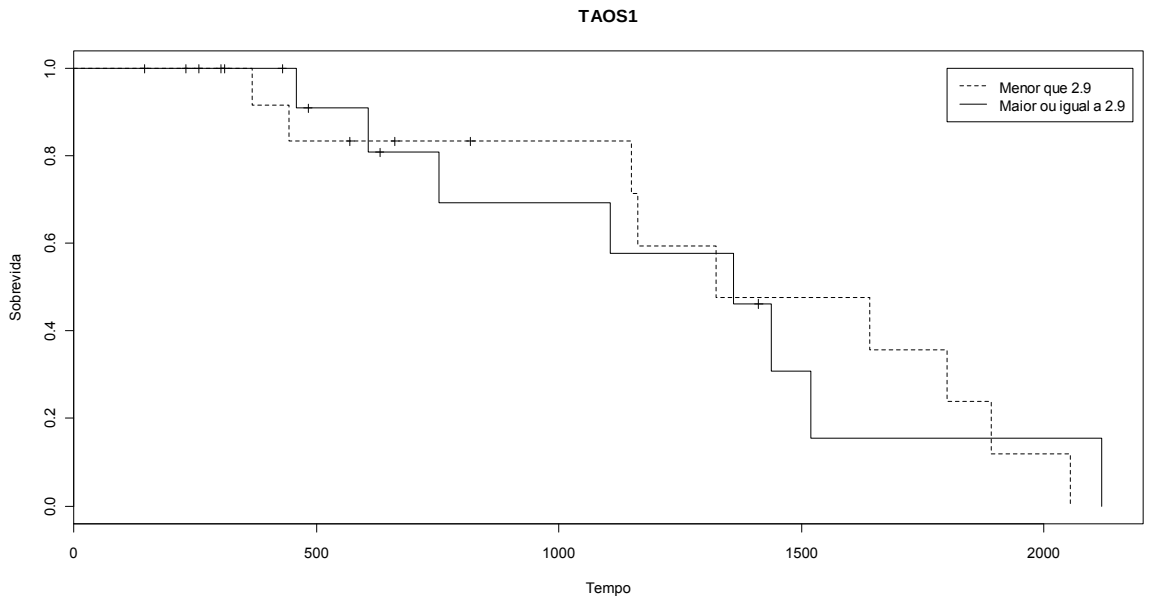


Gráfico 5.10 – Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para tumores com expressão acima ou abaixo do ponto de corte da expressão de *TAOS1* para diagnóstico de agressividade, obtidos da amostra de 29 indivíduos avaliados no estudo

6 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, incluindo o carcinoma epidermóide de boca, apresenta prognóstico sombrio, com mais de 50% de mortes pela doença ou devido a suas complicações num período de 5 anos após o diagnóstico (LO et al., 2003). Em estágios avançados, os pacientes frequentemente apresentam metástases linfonodais ou recorrência da doença. Assim como em outros tipos de tumores, o comprometimento linfonodal ainda representa o melhor parâmetro na predição do prognóstico (GRAU et al., 1997; GREENE et al., 2002), o que reflete um comportamento biológico tumoral específico de disseminação linfangiogênica (BOCKMUHL; KUCHLER; PETERSEN, 2000). Já o estadiamento pelo sistema TNM é amplamente utilizado para classificar os pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço baseando-se em exames clínicos e imaginológicos bem como análise histopatológica da peça cirúrgica (GREENE et al., 2002). Um sistema de estadiamento ideal deve propiciar uma predição precisa de sobrevivência. Como acontece em diversas outras neoplasias sólidas, a capacidade do estadiamento TNM em predizer o prognóstico do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é limitada, uma vez que pacientes com tumores no mesmo estadio clínico-patológico não apresentam a mesma progressão da doença, nem resposta ao tratamento clínico, taxa de recorrência da doença, e sobrevivência semelhantes (HALL et al., 1999).

O estadiamento TNM foi criado com base no prognóstico presumido, ou seja, nenhuma análise prospectiva e multivariada foi realizada para criar as várias combinações entre T, N e M desta classificação (PICCARILLO, 1995). Existem

tumores primários indetectáveis ou pequenos (T1 e T2) que apresentam uma agressividade biológica exibindo metástase regional (N+). De forma contrária, tumores de grandes dimensões (T3 e T4) podem levar tempo para originar metástases regionalmente (N0) e a distância (M0), sendo possível que tais pacientes apresentem um curso de vida livre de doença após tratamento (KADEMANI et al., 2005). Está bem estabelecido que a presença de metástases cervicais (N+) é o principal fator prognóstico em carcinoma epidermóide de boca, contribuindo com uma redução de 50% na sobrevida dos pacientes (GRANDI; ALLOSSIO; MOGLIA, 1985; SHAH, 1990; GASPAROTTO; MAESTRO, 2007). Em conjunto, esses achados corroboram com os critérios de agressividade estabelecidos no presente estudo, considerando o comprometimento linfonodal em tumores de menor diâmetro uma característica provável de tumores mais agressivos. Entretanto, embora tenha sido observado um maior número de pacientes vivos e sem recidiva no caso de tumores menos agressivos, não foi encontrada correlação entre esses eventos (óbito e recidiva) com os critérios de agressividade utilizados neste trabalho, possivelmente devido tamanho amostral insuficiente.

Claramente, o sistema de classificação atual necessita de melhorias significativas. Uma vez que pacientes com carcinoma epidermóide de boca podem apresentar metástases ocultas em pescoço, independente do tamanho do tumor, localização e drenagem linfática regional, a caracterização molecular do carcinoma epidermóide de boca para identificar subgrupos de pacientes que podem desenvolver uma doença mais agressiva pode fornecer informações relevantes (CHOI; CHEN, 2005). Com base nessa necessidade, outras possibilidades para definir critérios de agressividade podem ser pertinentes através, por exemplo, da classificação de grupos de tumores mais e menos agressivos conforme o desfecho

após o diagnóstico (óbito ou não) para obtenção de uma amostra mais homogênea, ou seja, de pacientes com o mesmo TNM, mas com desfechos distintos.

Os parâmetros histológicos prognósticos e que complementam o TNM incluem a profundidade da invasão, vascular e neural, infiltrado inflamatório peritumoral, extensão extracapsular linfonodal e grau histológico (CARVALHO; MAGRIN; KOWALSKI, 2003; MARCUS; ARENBERG; LE, 2004). O sistema de graduação histológica dos tumores, que compreende a classificação original de Broders (BRODERS, 1920), adotada pela *World Health Organization* (WHO) (PINDBORG et al., 1997), inclui três categorias, classificadas como grau 1 (bem diferenciado); grau 2 (moderadamente diferenciado); e grau 3 (pouco diferenciado). Esta mesma classificação é recomendada pela UICC para estabelecer o pTNM (SOBIN; WITTEKIND, 2002). Estima-se que mais de 50% dos carcinomas epidermóide de boca são classificados como moderadamente diferenciados (CARDESA et al., 2005); entretanto, a natureza subjetiva da avaliação, aliada à restrição da análise em relação às características estruturais das células tumorais, ao invés de aspectos funcionais, do estroma e de tecidos do hospedeiro, representam as possíveis falhas desse parâmetro, o que pode contribuir com a grande casuística de casos graduados como grau 2 (PINDBORG et al., 1997; WOOLGAR, 2006). Embora desde a década de 70, muitos estudos (ARTHUR; FARR, 1972; FARR, 1976; LANGDON et al., 1997; SHEAR; HAWKINS) apontem para uma correlação entre o grau histológico e a sobrevida, atualmente sabe-se que tal classificação (Broders/WHO) por si só não é suficiente para predizer prognóstico e resposta a terapia de forma personalizada (O-CHAROENRAT et al., 2003; PINDBORG et al., 1997; PO et al., 2002). De fato, no presente estudo, não foi observada correlação entre a diferenciação histopatológica com prognóstico, o que

pode ser explicado, em parte, pela ausência de casos classificados como pouco diferenciados na casuística utilizada, talvez uma consequência da subjetividade das classificações vigentes.

Ainda sobre os parâmetros histopatológicos, sabe-se que a presença de células tumorais em vasos sanguíneos (invasão vascular), linfáticos (invasão linfática) e em bainha perineural predispõe ao desenvolvimento de metástases linfonodais e a distância (CARVALHO; MAGRIN; KOWALSKI, 2003). Contudo, o presente estudo não revelou relação entre invasão vascular sanguínea, linfática e perineural com o prognóstico dos casos avaliados. De acordo com vários autores (ANNEROTH; HANSEN 1984; BRYNE et al., 1992), existem limitações na capacidade de detecção morfológica dessas características utilizando-se coloração de rotina (hematoxilina e eosina), o que pode ter influenciado nos resultados obtidos. Apesar de diversas variáveis clínico-patológicas terem sido validadas para classificar os pacientes de acordo com sua probabilidade de responder a terapia, acreditamos assim como outros autores (NIX et al., 2004) que estes parâmetros são de baixo valor preditivo. Portanto, há uma necessidade de marcadores moleculares que possam prever, por exemplo, a possibilidade de metástase ou a resposta terapêutica, aumentando o poder preditivo dos atuais marcadores clínicos, visto que o sistema de estadiamento TNM não responde adequadamente a heterogeneidade destes tumores a nível molecular, aspecto este de grande relevância (RODRIGO et al., 2009).

Embora alterações gênicas já tenham sido identificadas durante a transformação maligna, o entendimento do perfil genômico em larga escala do carcinoma epidermóide de boca ainda é limitado (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000). Assim, a determinação desse perfil pode ser útil na análise dos eventos

envolvidos na gênese e progressão do carcinoma epidermóide de boca a fim de contribuir para um melhor entendimento desta doença (CHEN et al., 2004).

Bockmuhl, Kuchler e Petersen (2000) ao estudarem por CGH carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, em que a boca foi um dos sítios incluídos, observaram que as alterações genéticas como ganhos em 3q21-29 e 11q13, e perda em 8p21-22 funcionaram como marcadores prognóstico, sendo inclusive mais relevante que os parâmetros clínicos como o comprometimento linfonodal. Assim, aponta-se claramente para a viabilidade e a necessidade de uma caracterização genética deste tipo de câncer, o que possivelmente levaria a identificação de subgrupos de pacientes, e mesmo a condução para um tratamento individualizado, e com isso, melhorar o prognóstico desta doença. A região 11q13 especificamente contém 353 genes (GOLLIN, 2001), sendo que alterações nesta região estão associadas com eventos precoces (IZZO et al., 1998) como também com lesões metastáticas, denotando a sua participação com eventos tardios da doença (BOCKMUHL et al., 2002), com a aneuploidia (CALLENDER et al., 1994; MEREDITH et al., 1995), pobre prognóstico (BOCKMUHL; KUCHLER; PETERSEN, 2000), recorrência tumoral e metástase a distância (NAMAZIE et al., 2002), o que denota uma controvérsia em qual estágio da doença as amplificações gênicas dessa região ocorrem.

As amplificações da região cromossômica 11q13 têm sido observadas em 30 a 50% dos carcinomas epidermóides da região de cabeça e pescoço, incluindo a cavidade bucal (GIBCUS et al., 2007; JIN et al., 2006a; SNIJDERS et al., 2005). Numa tentativa de relacionar as alterações genéticas com indicadores de prognóstico em carcinoma epidermóide de boca, Martin et al. (2008) utilizaram métodos de citogenética clássica e molecular e evidenciaram que amplificações da

região 11q13 são conduzidas por uma cascata de genes que oferecem vantagem de crescimento e metástases às células tumorais, estando estas alterações associadas com a diminuição na taxa de sobrevida dos pacientes. Estudos genéticos em amostras de carcinomas epidermóides de boca evidenciaram que existem tumores que apresentam grande ou pequena quantidade de aberrações no número de cópias de sequência de DNA (ganhos e perdas), sendo que ganhos na região 11q13 estiveram presentes em tumores com ambos os tipos de aberrações. Especificamente, tumores com grandes quantidades de aberrações apresentavam tamanho T3 ou T4, o que condiz com associação entre quantidade de aberrações e estádio da doença (NOUTOMI et al., 2006). Porém, a limitação em determinar o prognóstico de casos avançados de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço ainda é limitada (RODRIGO et al., 2009).

As amplificações do DNA cromossômico são fenômenos envolvidos no aumento do número de cópias de um gene, e trata-se de um mecanismo bem estabelecido em que as células o utilizam com o intuito de elevarem a sua expressão gênica durante o processo de desenvolvimento, oncogênese e resistência a drogas (ALBERTSON, 2006; STARK et al., 1989). Assim, os genes estudados devem preencher ao menos dois critérios: mostra-se frequentemente amplificado e apresentar correlação entre a amplificação do seu DNA com o aumento dos níveis de expressão. De acordo com Gibcus et al. (2008), para validar a importância da amplificação da região cromossômica 11q13, necessita-se também verificar a expressão gênica dos genes selecionados, para que esteja relacionada com a progressão tumoral. Estudos de mapeamento desta região em carcinomas epidermóides de laringe/faringe confirmaram através da análise por qRT-PCR esta correlação para os genes *TPCN2*, *CCND1*, *FLJ42258*, *ORAOV1 (TAOS1)*, *FGF19* e

CTTN. Ainda um aumento significativo da expressão dos genes *TPCN2*, *TAOS1*, *PPFIA1* e *FADD* foi visto em comparação a pacientes que não exibiam esta região cromossômica amplificada (GIBCUS et al., 2007). Já estudos em tumores primários de boca e em linhagens celulares de carcinoma epidermóide encontraram uma relação entre a hiper-expressão e a amplificação para os genes *TAOS1*, *TAOS2/TMEM16A*, *FADD*, *PPFIA1*, *CCND1*, *OCIM* e *CTTN* (HUANG et al., 2006), bem como em linhagens celulares de câncer de laringe e em tumores primários, nos quais os níveis de DNA e RNA encontraram-se relacionados para os genes *FADD* e *PPFIA1*, enquanto que os genes *CCND1* e *CTTN* mostraram-se altamente amplificados nesses tumores mas não necessariamente hiper-expressos nas mesmas amostras (JÄRVINEN et al., 2006).

A associação entre ganhos no cromossomo 11q13 e o prognóstico ruim tem sido constantemente reportada em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (AKERVALL et al., 1995; MEREDITH et al., 1995). Um dos genes relevantes desta região é o *CCND1*, que conduz a célula da fase G1 para a fase S do ciclo celular, no entanto a hiper-expressão deste gene parece ser um fator prognóstico independente, por não está estritamente relacionada com a amplificação do gene (AKERVALL et al., 1997). Assim, a hiper-expressão de outros genes da região cromossômica 11q13 pode estar relacionada a um pobre prognóstico, o que motivou as análises no presente estudo por qRT-PCR de genes que se mostraram hiper-expressos em análise prévia de dados de *microarray*, dentre eles *PPFIA1*, *CTTN*, *SHANK2*, *TAOS1* e *MMP-7*. Apesar da não validação dos achados de *microarray*, isto é tumores mais e menos agressivos não mostraram diferença estatisticamente significante, o que pode ser parcialmente atribuído à pequena casuística, vale ressaltar que os tumores menos agressivos sempre exibiram um menor nível de

expressão gênica em relação aos tumores mais agressivos, como também quando comparando as margens com os tumores. Além disso, embora a qualidade do RNA das amostras utilizadas tenha sido considerada boa ou satisfatória, algumas etapas metodológicas podem ter interferido nestes resultados. Por exemplo, a obtenção em momentos diferentes do cDNA para amplificação, bem como a padronização e o controle das condições de coleta das amostras frescas, podem ter contribuído negativamente nos resultados da expressão gênica, por ser a qPCR uma técnica de alta sensibilidade e especificidade.

Do ponto de vista da expressão gênica, a atenção tem sido direcionada para a investigação de uma cascata de genes na região 11q13 e não apenas em um ou dois genes isoladamente (HUANG et al., 2006). Ao compararmos a expressão do grupo de genes da região cromossômica 11q, apenas o gene *MMP-7* demonstrou uma diferença estatisticamente significante entre as margens e os tumores, apesar de todos os outros genes estudados, *PPFIA1*, *CTTN*, *SHANK2* e *TAOS1* também exibirem maior expressão nos tumores em comparação com suas respectivas margens, porém sem significância estatística. Esses dados precisam ser confirmados utilizando-se um maior número de casos e por meio da análise complementar da amplificação gênica nos tumores e nas margens não tumorais correspondentes.

Além disso, deve-se salientar o alto desvio padrão encontrado nas amostras estudadas de margem tumoral. Apesar das vantagens relativas a pertencerem aos mesmos pacientes das amostras tumorais coletadas, existe a possibilidade de que o epitélio morfologicamente normal adjacente ao tecido tumoral contenha alterações genéticas (HITTELMAN, 2001). Essa assertiva encontra sustentação na teoria da

cancerização de campo, que explica a formação de segundos tumores primários ou recorrências locais (BRAAKHUIS; LEEMANS; BRAKENHOFF, 2004), em que a presença de eventos clonais no epitélio normal circunjacente no momento da ressecção pode predizer recorrência local em alguns pacientes (CALIFANO et al., 1996). Estudos em tumores recorrentes e segundos tumores primários são escassos na literatura, logo a forma de avaliar a remoção cirúrgica do tumor ainda se faz através da análise das margens cirúrgicas histologicamente livre de neoplasia. Contudo, estudos realizados por Brennan et al. (1995) e Califano et al. (1996) em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, incluindo a boca, demonstraram que apesar das margens mostrarem-se livres de tumor histologicamente, estas podem apresentar alterações a nível molecular como a presença de mutações ou perda de heterozigose (LOH) no gene *TP53*, semelhantes às encontradas nos tumores primários. Considerando o conceito de cancerização de campo proposto por Slaughter, Southwick e Smejkal (1953) ainda é possível sugerir que margens histologicamente sadias possam não conter clones celulares do tumor original, e sim uma mucosa que apresente clones independentes (BEDI et al., 1996). No entanto, a utilização das margens cirúrgicas histologicamente livres de neoplasia como tecidos-controle em estudos de expressão gênica, apesar de não parecer ideal, não restringe a realização dos mesmos por aspectos éticos e é amplamente utilizada na literatura.

Chen et al. (2004) observou que os genes *CCND1*, *FGF4/FGF3*, e *CTTN* apresentaram ganhos importantes em carcinomas epidermóides de boca, relacionados a tumores com comprometimento linfonodal, o que realça a relevância dos genes na região 11q13 na progressão da doença. Correlacionando os níveis de expressão gênica dos genes pertencentes à região cromossômica 11q13,

especificamente *TAOS1* e *CTTN*, em carcinoma epidermóide de boca, com características clínicas e histopatológicas, alguns autores já observaram associação significativa com maior tamanho tumoral, presença de metástases linfonodais, pobre diferenciação histológica e estádios clínicos avançados (RODRIGO et al., 2000; XIA et al., 2007). Assim, buscamos também correlacionar a expressão gênica de alguns genes desta região cromossômica específica com aspectos clínicos e de comportamento tumoral, uma vez que se mostraram hiper-expressos em análise por *microarray* de amostras tumorais. Apesar de não encontrarmos correlações com dados de prognóstico em carcinoma epidermóide de boca, validações adicionais podem guiar a descoberta de candidatos a alvos terapêuticos desta região cromossômica, como sugeridos por outros autores, através de análises em nível genômico, proteômico e funcional a partir da diferença de expressão gênica encontrada, a fim de fornecer descobertas sobre o comportamento neoplásico (CHOI; CHEN, 2005; JÄRVINEN et al., 2008).

Estudos recentes utilizando linhagens celulares de carcinoma epidermóide de língua e de laringe encontraram, através de técnicas de *CGH-array* e *microarray*, genes semelhantes que exibiam nos dois sub-sítios maior número de cópia e aumento da expressão gênica dentre eles os genes *PPFIA1* e *CTTN* (JÄRVINEN et al., 2008). Esta observação sugere que, apesar das diferenças clínico-patológicas entre tumores dessas duas localizações, parece haver poucas diferenças no perfil genético molecular. Porém, em relação à localização, nossos achados de expressão por qRT-PCR em tumores de língua e assoalho exibiram uma expressão significativamente maior do gene *PPFIA1* em tumores de assoalho. Em concordância, estudos recentes sobre genes diferencialmente expressos em carcinoma epidermóide destes dois sub-sítios anatômicos, realçaram uma diferença

importante do perfil molecular principalmente no que diz respeito a grupos de genes que participam do processamento do mRNA, organização do citoesqueleto, processos metabólicos, ciclo celular e apoptose (SEVERINO et al., 2008).

Em relação à sobrevida, apesar de não observamos um valor estatisticamente significativo, os tumores mais agressivos demonstraram níveis de expressão de *PPFIA1* aumentados, existindo uma tendência de pacientes com tumores menos agressivos viverem mais quando apresentam valores de expressão de *PPFIA1* abaixo de 1,4 e de pacientes com tumores mais agressivos viverem menos quando demonstravam valores de expressão igual ou superior a 1,4 para este gene. A função do gene *PPFIA1* no câncer ainda é incerta (JÄRVINEN et al., 2006), contudo uma vez que este gene apresenta função na regulação da perda focal de adesão (SERRA-PAGES et al., 1995), acreditamos que sua hiper-expressão pode estar relacionada com agressividade tumoral. Tan et al. (2008), avaliaram de forma inédita a função do *PPFIA1* na carcinogênese de cabeça e pescoço, e além de encontrarem o gene *PPFIA1* amplificado na região 11q13 em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e em tumores primários, também evidenciaram sua maior expressão em estudos por *microarray* e validação por qRT-PCR. Porém, ao utilizarem a técnica de silenciamento por *siRNA knockdown*, investigaram a função do gene *PPFIA1* através de ensaios *in vitro* e de cicatrização de feridas, demonstrando que as células neoplásicas se tornaram mais invasivas quando os níveis protéicos de PPFIA1 estavam reduzidos, sugerindo a possível atuação do *PPFIA1* como um inibidor da invasão em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Assim, uma suposta associação entre a atividade do *PPFIA1* e interações célula/matriz-extracelular foi estabelecida por estes autores. As diferenças em relação ao que postulamos com os achados em mRNA pode se referir aos possíveis

eventos pós-transcricionais envolvidos nesta regulação, bem como uma carência do estudo em correlacionar os dados *in vitro* com o comportamento clínico dos tumores, a fim de suportar que os achados não se devam apenas a um fenômeno específico da linhagem celular utilizada. Assim, concordamos com TAN et al. (2008) na afirmação que a amplificação de genes da região 11q13 durante a carcinogênese da região de cabeça e pescoço pode recrutar a interação entre reguladores positivos e negativos da invasão celular, realçando a complexidade do papel dessa região cromossômica nesses tipos de tumores.

Além da proteína regulatória do ciclo celular Ciclina-D1 que atua da progressão de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, a região 11q13 contém diversos genes bem caracterizados e funcionalmente conhecidos em regular a motilidade via actina e a invasão, dentre eles o gene *CTTN/cortactina* (antes denominado EMS1) e o gene *SHANK2* (KELLEY; SHAHAB; WEED, 2008). A motilidade e invasividade da célula do câncer envolvem uma série de eventos complexos e integrados que é primeiramente controlado pela regulação e reorganização da actina do citoesqueleto (YAMAGUCHI; CONDEELIS, 2006; YAMAZAKI; KURISU; TAKENAWA, 2005). A caracterização da função biológica do gene *CTTN* em processos que controlam o ciclo celular e a migração esclareceu sua participação na tumorigênese (LUO et al., 2006; VAN ROSSUM; MOOLENAAR; SCHUURING, 2006). O gene *SHANK2*, por sua vez, encontra-se adjacente ao *CTTN* a uma distância de 31 kb, estando funcionalmente relacionados. Neste contexto, deve-se ressaltar que o gene *PPFIA1* se encontra a 14 kb do gene *CTTN*, também dividindo funções de interação célula-matriz, o que sugeriu a possível participação dos três genes na invasividade tumoral de carcinomas epidermóides de boca (HUANG et al., 2006). Isso é compreensível porque a desregulação do ciclo celular

por si só não é suficiente para explicar o comportamento biológico responsável pela progressão do tumor, que é caracterizada principalmente pelo aumento da invasividade e capacidade de formação de metástases (BOCKMUHL; KUCHLER; PETERSEN, 2000).

Recentemente, foi demonstrado que o gene *CTTN*, que codifica o homólogo humano da cortactina e cuja proteína está localizada no citoplasma e em áreas de contato de substrato celular (SCHUURING et al., 1993), é também recrutada para a degradação de matriz-extracelular neste tipo de tumor, enfatizando da sua função na invasão tumoral (CLARK et al., 2007). Estudos em linhagens celulares de carcinoma que exibiam amplificação da região 11q13 demonstraram que não apenas a super-expressão, mas também modificações pós-traducionais levam a redistribuição da cortactina do citoplasma para os sítios de contato célula-matriz (VAN DAMME et al., 1997). Isto fundamenta os estudos que apontam para o gene *CTTN* como desempenhando um papel central na motilidade e invasão do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, sugerindo que a intervenção terapêutica que atue na fosforilação, ou nos receptores, deste gene pode ser justificada para fins de controle de disseminação local-regional e metastático (KELLEY; SHAHAB; WEED, 2008).

Em estudos com xeno-tumores, o gene *CTTN* elevou o potencial de metástase de células neoplásicas da mama para o osso (LI et al., 2001), do carcinoma epidermóide do esôfago para o pulmão (LUO et al., 2006), e do carcinoma hepatocelular para metástases intra-hepáticas (CHUMA et al., 2004). Nos mesmos estudos, resultados divergentes foram encontrados para os efeitos sobre o crescimento do tumor primário, com uma significativa inibição do crescimento subcutâneo de tumores de esôfago injetados, através de silenciamento por siRNA

da CTTN/Cortactina, mas nenhum efeito da super-expressão da CTTN/Cortactina foi observado no crescimento de tumor ortotópico de mama ou tumor hepático (LI et al., 2001; CHUMA et al., 2004; LUO et al., 2006). Embora os estudos em tumores de mama e hepatocelulares não revelaram que a expressão Cortactina controla o tamanho tumoral, em três diferentes linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, incluindo linhagem de boca, observou-se que a Cortactina afeta características associadas ao crescimento do tumor, incluindo a vascularização do tumor, proliferação e apoptose (CLARK et al., 2009).

Clark et al. (2009) estudaram também o papel da CTTN/Cortactina na agressividade tumoral em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, incluindo linhagem de boca, revelando que o nível aumentado de CTTN/Cortactina afeta a agressividade do tumor independente deste gene estar ou não amplificado na região 11q13, sugerindo que a super-expressão da CTTN/Cortactina geralmente promove progressão tumoral, e corroborando com os achados do presente estudo de maior expressão gênica em tumores mais agressivos. Identificaram ainda, que alterações no crescimento de células com supressão de CTTN/Cortactina (knockdown) podem ser restabelecidas através de co-cultura com células que expressam a CTTN/Cortactina, indicando sua participação no controle da secreção autócrina de substâncias promotoras do crescimento. Esses autores acreditam que a secreção autócrina de múltiplos fatores, como fatores angiogênicos e de crescimento, proteases e moléculas da matriz extracelular, poderia explicar os efeitos da expressão da CTTN/Cortactina em diversos fenômenos celulares associados com a agressividade do tumor. A amplificação do gene *CTTN* também já foi associada com a pobre resposta clínica, com o maior tamanho do tumor, com o comprometimento linfonodal, a recorrência e a pouca diferenciação histológica do tumor (RODRIGO et

al., 2000). Contudo, dos 106 casos incluídos no referido estudo, apenas 5 casos pertenciam ao sítio intra-bucal, e dentre estes apenas um caso demonstrou amplificação gênomica de *CTTN*, sendo que os demais tumores encontraram-se localizados em orofaringe, hipofaringe, glote e supraglote. Assim, atribuímos os achados contraditórios com os dados de expressão do nosso estudo possivelmente a este fato, pois além de demonstrarmos uma tendência de expressão gênica do *CTTN* em tumores bem diferenciados histologicamente, não encontramos associação do mesmo com dados de comportamento e agressividade tumoral. Em estudos subsequentes de Rodrigo et al (2009), além dos autores correlacionarem a expressão gênica e protéica com a amplificação genômica de *CTTN*, confirmaram que a amplificação para este gene teve maior impacto no prognóstico e sobrevida em tumores de laringe em detrimento a tumores de faringe, podendo servir como marcador valioso na identificação de sub-populações de pacientes com risco aumentado para um pobre controle da doença e que estes possam se beneficiar de tratamento e acompanhamento mais rigoroso.

Em carcinoma epidermóide de boca o gene *CTTN* encontra-se frequentemente co-amplificado com o gene *SHANK2* (FREIER et al., 2006), e o produto protéico destes genes interagem diretamente (DU et al, 1998). Isto sugere que Shank2 promove uma ligação molecular entre os receptores transmembrana e a actina do citoesqueleto através da Cortactina. A Shank2 também interage com a Sharpin, uma proteína de função desconhecida cujo gene também está presente e amplificado na região cromossômica 11q13 (LIM et al., 2001). Embora a relevância funcional da hiper-expressão do gene *SHANK2* no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço seja incerta, existe uma possibilidade que este participe da invasão celular devido a sua associação com a cortactina e a dinamina 2

(OKAMOTO et al., 2001), proteínas requeridas na protrusão da invadopodia (organela sub-celular associada com a degradação da matriz extracelular) e degradação da matriz extra-celular (BALDASSARRE et al., 2003). Porém, existem poucos trabalhos que relatam a participação e função biológica do gene *SHANK2* no câncer de boca e que esclareçam os referidos achados. No presente estudo, apesar de ter sido observado como o segundo gene de maior expressão em carcinomas epidermóides de boca, não foi possível estabelecer uma relação dos achados de expressão deste gene nos tecidos tumorais em comparação com as margens não-tumorais, nem mesmo com os parâmetros clínicos e de agressividade tumoral, o que acreditamos que tenha ocorrido devido ao pequeno tamanho amostral.

Outros estudos também correlacionaram a expressão do *CTTN* com MMPs, devido ao seu recrutamento para secreção de MMP-2 e MMP-9 em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CLARK et al., 2007). Assim como o gene *CTTN*, a matrilisina (*MMP-7*) tem o potencial de iniciar uma ativação em cascata de MMPs, tais como MMP-2 e MMP-9, facilitando a invasão tumoral e aparentemente mediando processos proteolíticos dos fatores de necrose tumoral e ativador de plasminogênio uroquinase (SIRES et al., 1994; WILSON; MATRISIAN, 1996; WANG et al., 2005).

Sabe-se que *MMP-7* apresenta características peculiares como o ampla especificidade de substrato, promovendo invasão celular e angiogênese no câncer através da clivagem proteolítica da matriz extracelular e de proteínas da membrana basal, tais como fibronectina, colágeno tipo IV, laminina, elastina, entactina, osteopontina, e agregados de proteoglicanos da cartilagem (WILSON; MATRISIAN, 1996; YOKOHAMA et al., 2008). Estudos de expressão gênica por qRT-PCR revelaram que o gene *MMP-7* exibiu um nível de expressão elevado em carcinomas

epidermóide de boca em comparação com o tecido não-tumoral (SNIJDERS et al., 2005), corroborando com os achados do presente estudo. É possível que este gene desempenhe papel na tumorigênese baseando-se na sua conhecida função na adesão e migração celular, também sugerido por Snijders et al. (2005), e devido a grande diferença de expressão encontrada para este gene no presente estudo em relação às margens não-tumorais.

A super-expressão em diversos tecidos tumorais, assim como em estudos *in vitro* e *in vivo*, sugere que a MMP-7 além de participar da iniciação e crescimento tumoral (WITTY et al., 1994) também atua na invasão tumoral (ITOH et al., 1996; POWELL et al., 1993) e metástase (ADACHI et al., 1999). Yamamoto et al. (1999) relatou em casos de carcinoma epidermóide de esôfago relação entre a expressão protéica de MMP-7 com profundidade da invasão tumoral, estágios avançados da doença, recorrência e menor sobrevida, sugerindo a sua expressão como um fator preditivo importante. Ainda a nível protéico, estudos em carcinoma epidermóide de boca revelaram que a expressão da MMP-7 esteve associada com maior tamanho tumoral e com tumores com presença de invasão óssea e cutânea, relacionado assim este marcador com a agressividade tumoral (CHUANG et al., 2008). Não encontrarmos, no entanto, ao nível da expressão de mRNA, uma relação significante do gene *MMP-7* com a agressividade tumoral e com parâmetros clínico-patológicos, porém foram observados maiores níveis de expressão gênica em tumores menos agressivos, o que pode estar relacionado a sua importância no crescimento tumoral já que referiam-se a tumores T3 e T4.

Apesar da função do gene *TAOS1* ainda permanece desconhecida, a sua proximidade com o gene *CCND1* (aproximadamente 11.1 kb) estabeleceu a relação do gene *TAOS1* com o câncer, supondo sua participação no controle do ciclo celular

e proliferação (XIA et al., 2007). Estudos em leucoplasias e em carcinomas epidermóides de boca revelaram que a amplificação do gene *TAOS1* juntamente com o gene *CTTN* participam de diferentes estágios da progressão tumoral, sendo que em tecido normal e com ausência de displasia epitelial nenhuma amplificação gênica foi detectada, enquanto que em tumores com presença de metástases, a amplificação para ambos os genes aumentou significantemente, sugerindo uma possível participação dos mesmos na carcinogênese de boca. Nesse estudo o gene *TAOS1* esteve amplificado em etapas mais precoces da carcinogênese do que o gene *CTTN* (XIA et al., 2007). Não observamos, contudo, esta diferença no nível de expressão gênica entre tecido tumoral e suas respectivas margens para o gene *TAOS1*, acreditando que se deva aos eventos supracitados no que diz respeito ao uso de margens cirúrgicas.

O gene *TAOS1* tem demonstrado apresentar valor prognóstico na predição de desfecho em pacientes com carcinoma epidermóide de boca (HUANG et al., 2002; XIA et al., 2007), estando a sua amplificação genômica associada com maior tamanho tumoral, mestástases linfonodais, pouca diferenciação histológica e estádio clínico avançado (XIA et al., 2007). Esses achados são condizentes com o potencial oncogênico do gene *TAOS1* neste tipo de neoplasia, e sua possível utilização como marcador molecular no diagnóstico, prognóstico e tratamento. Jiang et al. (2008) investigaram a função do gene *TAOS1* na carcinogênese de boca silenciando a sua expressão através de siRNA, e descobriram que linhagens celulares com redução da expressão gênica exibiram diminuição do crescimento celular *in vitro*, da angiogênese e do crescimento tumoral *in vivo*. Esses resultados indicam o gene *TAOS1* como um novo alvo que pode ser explorado com finalidades terapêuticas no

carcinoma epidermóide de boca, principalmente por apresentar eficácia na redução do crescimento tumoral.

Apesar da expressão diferencial do gene *TAOS1* ter sido encontrada em tecido normal e em carcinoma epidermóide de boca por análise qualitativa e quantitativa do mRNA, Jiang et al. (2009) demonstraram através de análise quantitativa que não existiu associação significante entre os níveis de expressão gênica e as variáveis clínico-patológicas avaliadas, corroborando com os achados do presente estudo. Entretanto, os níveis de expressão de *TAOS1* aumentou gradualmente com a diminuição do grau de diferenciação tumoral, estando consistente com dados semi-quantitativos prévios de expressão em carcinoma epidermóide de boca (XIA et al., 2007). De forma controversa, observamos uma tendência de maior expressão do gene *TAOS1* em tumores bem diferenciados, sendo que a discordância nos achados pode ser justificada por não apresentarmos na casuística, casos pouco diferenciados, limitando o poder distintivo do estudo.

7 CONCLUSÕES

1) Os transcritos de cinco genes do cromossomo 11 (*CTTN*, *MMP-7*, *PPFIA1*, *SHANK2* e *TAOS1*) são expressos no carcinoma epidermóide de boca.

2) Apenas o gene *MMP-7* apresentou expressão diferencial entre as amostras de carcinoma epidermóide de boca e suas respectivas margens não tumorais, sugerindo uma possível participação desse gene no desenvolvimento da neoplasia.

3) A expressão dos genes *CTTN*, *MMP-7*, *SHANK2* e *TAOS1* não está relacionada com as características clínico-patológicas dos tumores, indicando que a expressão de transcritos destes genes podem não contribuir na agressividade tumoral e prognóstico em carcinoma epidermóide de boca.

4) A expressão do gene *PPFIA1* está relacionada com carcinoma epidermóide localizado em assoalho, sugerindo que este gene possa atuar em tumores com perfil molecular específico.

5) Os dados sugerem um possível valor prognóstico para a presença de transcritos do gene *PPFIA1* na dependência da agressividade tumoral, já que a expressão elevada de *PPFIA1* aparentemente pode implicar em um menor tempo de sobrevida global.

REFERÊNCIAS[1]

Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K. Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. Gut 1999;45(2):252-8.

Adachi Y, Itoh F, Yamamoto H, Matsuno K, Arimura Y, Kusano M, et al. Matrix metalloproteinase matrilysin (MMP-7) participates in the progression of human gastric and esophageal cancers. Int J Oncol 1998;13(5):1031-5.

Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. Nature Genet 2000;25:144–6.

Albertson DG, Collins C, Mccormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. Nat Genet 2003;34:369-76.

Albertson DG. Gene amplification in cancer. Trends Genet 2006;22:447-55.

Anneroth G, Hansen LS. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. Scand J Dent Res 1984;92:448-68.

Akervall JA, Jin Y, Wennerberg JP, Zatterstrom UK, Kjellen E, Mertens F, et al. Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer 1995;76:853-9.

Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, et al. Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. Cancer 1997;79:380-9.

Araújo Júnior RF, Costa A LL, Ramos CCF. Clinical- pathological parameters as prognostic indicators in oral squamous cell. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2006; 6(2):125-30.

[1] De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

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

Arthur K, Farr HW. Prognostic significance of histologic grade in epidermoid carcinoma of the mouth and pharynx. Am J Surg 1972;124:489–92.

Baldassarre M, Pompeo A, Beznoussenko G, Castaldi C, Cortellino S, McNiven MA, et al. Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. Mol Biol Cell. 2003;14(3):1074-84.

Baldwin C, Garnis C, Zhang L, Rosin MP, Lam WL. Multiple microalterations detected at high frequency in oral cancer. Cancer Res 2005;65(17):7561-7.

Beder LB, Gunduz M, Ouchida M, Fukushima K, Gunduz E, Ito S, et al. Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinoma. Lab Invest 2003;83(1):99-105.

Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D. Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. Cancer Res 1996;56:2484-7.

Berenson JR, Koga H, Yang J, Pearl J, Holmes EC, Figlin R. Frequent amplification of the bcl-1 locus in poorly differentiated squamous cell carcinoma of the lung.The Lung Cancer Study Group. Oncogene 1990;5:1343-8.

Bockmuhl U, Kuchler I, Petersen I. Improved prognostic assessment of head-neck carcinomas by new genetic markers. HNO 2000;48:451-56.

Bockmuhl U, Schluns K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I. Chromosomal alterations during metastasis formation of head and neck squamous cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 2002;33(1):29-35.

Bolon I, Devouassoux M, Robert C, Moro D, Brambilla C, Brambilla E. Expression of urokinase-type plasminogen activator, stromelysin 1, stromelysin 3, and matrilysin genes in lung carcinomas. Am J Pathol 1997;150(5):1619-29.

Borg A, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SA, Olsson H, et al. Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis. Br J Cancer 1991;63:136–42.

Bowden ET, Onikoyi E, Slack R, Myoui A, Yoneda T, Yamada KM, et al. Co-localization of cortactin and phosphotyrosine identifies active invadopodia in human breast cancer cells. Exp Cell Res 2006;312(8):1240-53.

Braakhuis BJM, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. J Oral Pathol Med 2004;33:317-22.

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

Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 1995;332:429-35.

Broders AC. Squamous-cell epithelioma of the lip. J Am Dent Assoc 1920;74:656–64.

Broumand V, Lozano TE, Gomez JA. Evaluation and staging of oral cancer. Oral Maxillofac Surg Clin North Am 2006;18(4):435-44.

Bruder CE, Hirvela C, Tapia-Paez I, Fransson I, Segraves R, Hamilton G, et al. High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. Human Mol Genet 2001;10:271-82.

Bryne M, Koppang H, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. J Pathol 1992;166:375-81.

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res 1996;56(11):2488-92.

Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. Cancer 1994;74(1):152-8.

Cardesa A, Gale N, Nadal A, Zidar N. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics. Head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p. 119–23.

Carvalho AL, Magrin J, Kowalski LP. Sites of recurrence in oral and oropharyngeal cancers according to the treatment approach. Oral Dis 2003;9(3):112-8.

Cavenee WK, White RL. The genetic basis of cancer. Sci Am 1995;272:72–79.

Choi P, Chen C. Genetic expression profiles and biologic pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer 2005;104(6):1113-28.

Colosimo EA, Giolo SR. Análise de Sobrevivência Aplicada. São Paulo: Editora Blucher; 2006.

Costa A de LL, Araújo Júnior RF, Ramos CCF. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. Braz J Otorhinolaryngol 2005;71(2):181-87.

Costa A de L, Pereira JC, Nunes AAF, Arruda M de LS. Correlation between TNM classification, histological grading and anatomical location in oral squamous cell carcinoma. Pesqui Odontol Bras 2002;16(3):216-20.

Chen YJ, Lin SC, Kao T, Chang CS, Hong PS, Shieh TM, et al. Genome-wide profiling of oral squamous cell carcinoma. J Pathol 2004;204(3):326–32.

Chen PH, Shieh TY, Ho PS, Tsai CC, Yang YH, Lin YC et al. Prognostic factors associated with the survival of oral and pharyngeal carcinoma in Taiwan. BMC Cancer 2007;7(101):1-13.

Chuang HC, Su CY, Huang HY, Huang CC, Chien CY, Du YY, et al. Active matrix metalloproteinase-7 is associated with invasion in buccal squamous cell carcinoma. Mod Pathol 2008;21(12):1444-50.

Chuma M, Sakamoto M, Yasuda J, Fujii G, Nakanishi K, Tsuchiya A et al. Overexpression of cortactin is involved in motility and metastasis of hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2004;41:629-36.

Clark ES, Whigham AS, Yarbrough WG, Weaver AM. Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. Cancer Res 2007;67(9):4227-35.

Clark ES, Brown B, Whigham AS, Kochaishvili A, Yarbrough WG, Weaver AM. Aggressiveness of HNSCC tumors depends on expression levels of cortactin, a gene in the 11q13 amplicon. Oncogene 2009;28(3):431-44.

Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. J Clin Oncol 1993;11(10):1873-8.

de Araújo RF Jr, Barboza CA, Clebis NK, de Moura SA, Costa ALL. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2008;13(6):E344-47.

Denoix PF. Nomenclature des Cancer. Bull Inst Nat Hyg 1944;69-73.

Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Rev 2006;25(1):9-34.

Dib LL, Sabba LMB, Marques LA, Araújo NS. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of tongue: clinical and histopathological analysis. Acta Oncol Bras 1994; 14(2):88-93.

Dimery IW, Hong WK. Overview of combined modality therapies for head and neck cancer [review]. J Natl Cancer Inst 1993;85:95-11.

Du Y, Weed SA, Xiong WC, Marshall TD, Parsons JT. Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. Mol Cell Biol 1998;18(10):5838-51.

Freier K, Sticht C, Hofele C, Flechtenmacher C, Stange D, Puccio L, et al. Recurrent coamplification of cytoskeleton-associated genes EMS1 and SHANK2 with CCND1in oral squamous cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 2006;45:118-25.

Gansauge S, Gansauge F, Ramadani M, Stobbe H, Rau B, Harada N, et al. Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. Cancer Res 1997;57(9):1634-7.

Gasparotto D, Maestro R. Molecular approaches to the staging of head and neck carcinomas (review). Int J Oncol 2007;31:175–80.

Gibcus JH, Kok K, Menkema L, Hermsen MA, Mastik M, Kluin PM, et al. High-resolution mapping identifies a commonly amplified 11q13.3 region containing multiple genes flanked by segmental duplications. Hum Genet 2007;121(2):187-201.

Gibcus JH, Menkema L, Mastik MF, Hermsen MA, de Bock GH, van Velthuysen ML, et al. Amplicon mapping and expression profiling identify the Fas-associated death domain gene as a new driver in the 11q13.3 amplicon in laryngeal/pharyngeal cancer. Clin Cancer Res 2007;13(21):6257-66.

Gibcus JH, Mastik MF, Menkema L, de Bock GH, Kluin PM, Schuuring E, et al. Cortactin expression predicts poor survival in laryngeal carcinoma. Br J Cancer 2008;98(5):950-55.

Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE, et al. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Res 2004;64(1):55-63.

Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of the disease. Head Neck 2001;23(3):238–53.

Graesslin O, Cortez A, Fauvet R, Lorenzato M, Birembaut P, Daraï E Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study. Ann Oncol 2006;17(4):637-45.

Grandi C, Allossio M, Moglia DEA: Prognostic significance of lymphatic spread in head and neck carcinomas: therapeutic implications. Head Neck Surg 1985;8:67-73.

Grau JJ, Cuchi A, Traserra J, Firvida L, Arias C, Blanch JL, et al. Follow-up study in head and neck cancer. Cure rate according to tumor location and stage. Oncology 1997;54:38–42.

Greene FL, Page D, Morrow M, Balch C, Haller D, Fritz A, et al. AJCC cancer staging manual. 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002.

Hall SF, Groome PA, Rothwell D, Dixon PF. Using TNM staging to predict survival in patients with squamous cell carcinoma of head and neck. Head Neck 1999;21:30-8.

Han W, Kim KH, Jo MJ, Lee JH, Yang J, Doctor RB, et al. Shank2 associates with and regulates Na+/H+ exchanger 3. J Biol Chem 2006;281(3):1461-9.

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

Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco induced cancer. Nat Rev Cancer 2003;3(10):733–44.

Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. Am J Pathol 1996;149(1):273-82.

Hittelman WN. Genetic instability in epithelial tissues at risk for cancer. Ann N Y Acad Sci 2001;952:1-12.

Huang X, Gollin SM, Raja S, Godfrey TE. High resolution mapping of the 11q13 amplicon and identification of a gene, TAOS1, that is amplified and overexpressed in oral cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:11369-74.

Huang X, Godfrey TE, Gooding WE, McCarty KS Jr, Gollin SM. Comprehensive Genome and Transcriptome Analysis of the 11q13 Amplicon in Human Oral Cancer and Synteny to the 7F5 Amplicon in Murine Oral Carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 2006;45:1058–69.

Hughes-Davies L, Huntsman D, Ruas M, Fuks F, Bye J, Chin SF, et al. EMSY links the BRCA2 pathway to sporadic breast and ovarian cancer. Cell 2003;115(5):523-35.

Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. Nat Rev Cancer 2005;5(2):127–35.

Ibrahim SO, Aarsaether N, Holsve MK, Kross KW, Heimdal JH, Aarstad JH, et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinomas and matching normal oral mucosa tissues from black Africans and white caucasians: The case of the Sudan vs. Norway. Oral Oncol 2003;39:37-48.

Itoh F, Yamamoto H, Hinoda Y, Imai K. Enhanced secretion and activation of matrilysin during malignant conversion of human colorectal epithelium and its relationship with invasive potential of colon cancer cells. Cancer 1996;77:1717-21.

Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Li XQ, Ibarguen H, Lee JS, Ro JY, et al. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo

evidence for an association with subsequent gene amplification. Oncogene 1998;17(18):2313-22.

Janssen JW, Cuny M, Orsetti B, Rodriguez C, Vallés H, Bartram CR, et al. MYEOV: a candidate gene for DNA amplification events occurring centromeric to CCND1 in breast cancer. Int J Cancer 2002;102:608-14.

Järvinen AK, Autio R, Haapa-Paananen S, Wolf M, Saarela M, Grénman R, et al. Identification of target genes in laryngeal squamous cell carcinoma by high-resolution copy number and gene expression microarray analyses. Oncogene 2006;25:6997-7008.

Järvinen AK, Autio R, Kilpinen S, Saarela M, Leivo I, Grénman R, et al. High-Resolution Copy Number and Gene Expression Microarray Analyses of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines of Tongue and Larynx. Genes Chromosomes Cancer 2008;47:500-9.

Jiang L, Yang HS, Wang Z, Zhou Y, Zhou M, Zeng X, et al. ORAOV1-A correlates with poor differentiation in oral cancer. J Dent Res 2009;88(5):433-8.

Jin C, Jin Y, Wennerberg J, Annertz K, Enoksson J, Mertens F. Cytogenetic abnormalities in 106 oral squamous cell carcinomas. Cancer Genet Cytogenet 2006a;164(1):44–53.

Jin C, Jin Y, Gisselsson D, Wennerberg J, Wah TS, Strömbäck B, et al. Molecular cytogenetic characterization of the 11q13 amplicon in head and neck squamous cell carcinoma. Cytogenet Genome Res 2006b;115(2):99-106.

Jin C, Jin Y, Gisselsson D, Wennerberg J, Wah TS, Strömbäck B, et al. Nonrandom chromosome abnormalities in short-term cultured primary squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res 1995;55(14):3204-10.

Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B, et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. J Oral Maxillofac Surg 2005;63(11):1599-605

Kademani D. Oral cancer. Mayo Clin Proc 2007;82:878-87.

Kelley LC, Shahab S, Weed SA. Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer. Clin Exp Metastasis 2008;25(4):289-304.

Keski-Santti H, Atula T, Tikka J, Hollmen J, Makitie AA, Leivo I. Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. Oral Oncol 2007;43(10):1007–13.

Kiaris H, Spandidos DA, Jones AS, Vaughan ED, Field JK. Mutations, expression and genomic instability of the H-ras proto-oncogene in squamous cell carcinoma of the head and neck. Br J Cancer 1995;72:123-8.

Kitagawa Y, Ueda M, Ando N, Shinozawa Y, Shimizu N, Abe O. Significance of int-2/hst-1 coamplification as a prognostic factor in patients with esophageal squamous carcinoma. Cancer Res 1991;51:1504–8.

Koch WM, Brennan JA, Zahurak M, Goodman SN, Westra WH, Schwab D, et al. p53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. J Natl Cancer Inst 1996;88(21):1580-6.

Lammie GA, Fantl V, Smith R, Schuuring E, Brookes S, Michalides R, et al. D11S287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to BCL-1. Oncogene 1991;6:439-44.

Langdon JD, Harvey PW, Rapidis AD, Patel MF, Johnson NW. Oral cancer: the behaviour and response to treatment of 194 cases. J Maxillofac Surg 1997;5:221–37.

Larsen SR, Johansen J, Sørensen JA, Krogdahl A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 2009;38(8):657-62.

Le Tourneau C, Velten M, Jung GM, Bronner G, Flesch H, Borel C. Prognostic indicators for survival in head and neck squamous cell carcinomas: analysis of a series of 621 cases. Head Neck 2005;27(9):801-8.

Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastasis as a prognostic factor. Cancer 1994;73(1):187-90.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. Nature 1998;396:643–49.

Lese CM, Rossie KM, Appel BN, Reddy JK, Johnson JT, Myers EN, et al. Visualization of INT2 and HST1 amplification in oral squamous cell carcinomas. Genes Chromosomes Cancer 1995;12(4):288–95.

Li Y, Tondravi M, Liu J, Smith E, Haudenschild CC, Kaczmarek M, et al. Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. Cancer Res 2001;61:6906-11.

Lim S, Sala C, Yoon J, Park S, Kuroda S, Sheng M, et al. Sharpin, a novel postsynaptic density protein that directly interacts with the shank family of proteins. Mol Cell Neurosci 2001;17(2):385–97.

Lin SC, Chen YJ, Kao SY, Hsu MT, Lin CH, Yang SC, et al. Chromosomal changes in betelassociated oral squamous cell carcinomas and their relationship to clinical parameters. Oral Oncol 2002;38:266-73.

Liotta, LA, Kohn, EC. Stromal therapy: the next step in ovarian cancer treatment. J Natl Cancer Inst 2002;94(15):1113-4.

Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RC. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. J Oral Maxillofac Surg 2003;61:751-58

Luo ML, Shen XM, Zhang Y, Wei F, Xu X, Cai Y et al. Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance. Cancer Res 2006;66:11690–9.

Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, et al. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. Cancer Cell 2005;7(5):485-96.

Mamelle G, Pampurik J, Luboinski B, Lancar R, Lusinchi A, Bosq J. Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. Am J Surg 1994;168(5):494-8.

Marcus B, Arenberg D, Le J. Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Cancer 2004;101(12):2779-87.

Martin CL, Reshmi SC, Ried T, Gottberg W, Wilson JW, Reddy JK, et al. Chromosomal imbalances in oral squamous cell carcinoma: examination of 31 cell lines and review of the literature. Oral Oncol 2008;44(4):369-82.

Martinez-Conde R, Aguirre JM, Burgos JJ, Rivera JM. Clinicopathological factors in early squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth, in Biscay (the Basque Country, Spain). Med Oral 2001;6(2):87-94.

Martinez-Quiles N, Ho HY, Kirschner MW, Ramesh N, Geha RS (2004) Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate NWASP. Mol Cell Biol 24(12):5269-80.

Mashberg A, Barsa P. Screening for oral and oropharyngeal squamous carcinomas. CA Cancer J Clin 1984;34(5):262–68.

Meredith SD, Levine PA, Burns JA, Gaffey MJ, Weiss LM, Erickson NL, et al. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995;121:790-94.

Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, Cohn DE, Kelbick N, Copeland L, et al. HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. J Clin Oncol 2006;24:2376-85.

Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M, et al. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. Laryngoscope 2002;112:472-81.

Nix PA, GreenmanJ, Cawkwell L, Stafford ND. Defining the criteria for radioresistant laryngeal cancer. Clin Otolaryngol Allied Sci 2004;29:705-8.

Noutomi Y, Oga A, Uchida K, Okafuji M, Ita M, Kawauchi S, et al. Comparative genomic hybridization reveals genetic progression of oral squamous cell carcinoma from dysplasia via two different tumourigenic pathways. J Pathol 2006;210(1):67-74.

Odell E, Jani P, Sherriff M. The prognostic value of individual grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. Cancer 1994;74:789-94.

O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, et al. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early tongue cancer. Oral Oncol 2003;39:386-90.

Okafuji M, Ita M, Oga A, Hayatsu Y, Matsuo A, Shinzato Y, et al. The relationship of genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization to DNA ploidy and tumor size in human oral squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med 2000;29:226-31.

Okamoto PM, Gamby C, Wells D, Fallon J, Vallee RB. Dynamin isoform-specific interaction with the shank/ProSAP scaffolding proteins of the postsynaptic density and actin cytoskeleton. J Biol Chem 2001;276(51):48458–65.

Overall, CM, López-Otín, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. Nat Rev Cancer 2002;2(9):657-72.

Pacheco MM, Kowalski LP, Nishimoto IN, Brentani MM. Differential expression of c-jun and c-fos mRNAs in squamous cell carcinoma of the head and neck: associations with uPA, gelatinase B, and matrilysin mRNAs. Head Neck 2002;24(1):24-32.

Parise Jr, O. Câncer de Boca – Aspectos Básicos e Terapêuticos. 1ª ed, São Paulo: Sarvier, 2000

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

Patmore HS, Cawkwell L, Stafford ND, Greenman J. Unraveling the Chromosomal Aberrations of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Review. Ann Surg Oncol 2005;12(10):831-42.

Piccarillo JF. Purposes, problems and proposals for progress in cancer staging. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995;121:145–9.

Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. World Health Organisation histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. 2nd ed. New York: Springer, 1997.

Po WYA, Lam KY, Lam LK, Ho CM, Wong A, Chow TL, et al. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma—a comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimenco score, and pathologic features. Head Neck 2002;24:513-20.

Powell WC, Knox JD, Navre M, Grogan TM, Kittelson J, Nagle RB, et al. Expression of the metalloproteinase matrilysin in DU-145 cells increases their invasive potential in severe combined immunodeficient mice. Cancer Res 1993;53:417-22.

Proctor AJ, Coombs LM, Cairns JP, Knowles MA. Amplification at chromosome 11q13 in transitional cell tumours of the bladder. Oncogene 1991;6:789–95.

Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS—1/NK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res 1996;56(16):3630-3.

Reid CB, Snow GB, Brakenhoff RH, Braakhuis BJ. Biologic implications of genetic changes in head and neck squamous cell carcinogenesis. Aust N Z J Surg 1997; 67:410–6.

Reshmi SC, Saunders WS, Kudla DM, Ragin CR, Gollin SM. Chromosomal instability and marker chromosome evolution in oral squamous cell carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 2004;41(1):38-46.

Rodrigo JP, Garcia LA, Ramos S, Lazo PS, Suarez C. EMS1 gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. Clin Cancer Res 2000;6(8):3177–82.

Rodrigo JP, García-Carracedo D, García LA, Menéndez S, Allonca E, González MV, et al. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. J Pathol 2009;217(4):516-23.

Rosin MP, Lam WL, Poh C, Le ND, Li RJ, Zeng T, et al. 3p14 and 9p21 loss is a simple tool for predicting second oral malignancy at previously treated oral cancer sites. Cancer Res 2002;62(22):6447-50.

Rothschild BL, Shim AH, Ammer AG, Kelley LC, Irby KB, Head JA, et al. Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. Cancer Res 2006;66(16):8017-25.

Roz L, Wu CL, Porter S, Scully C, Speight P, Read A, et al. Allelic imbalance on chromosome 3p in oral dysplastic lesions: an early event in oral carcinogenesis. Cancer Res 1996;56(6):1228-31.

Saunders WS, Shuster M, Huang X, Gharaibeh B, Enyenihi AH, Petersen I, et al. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:303-8.

Schuuring E. The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: Cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes - A review. *Gene* 1995;159:83-96.

Schuuring E, Verhoeven E, Litvinov S, Michalides RJ. The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. Mol Cell Biol 1993;13:2891-8.

Schuuring E, Verhoeven E, Mooi WJ, Michalides RJ. Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. Oncogene 1992;7:355-61.

Schuuring E, van Damme H, Schuuring-Scholtes E, Verhoeven E, Michalides R, Geelen E, et al. Characterization of the EMS1 gene and its product, human Cortactin. Cell Adhes Commun 1998;6:185-209.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. Oral Oncol 2000;36:256-63.

Schwab M. Oncogene amplification in solid tumors. Semin Cancer Biol 1999;9(4):319-25.

Serra-Pages C, Kedersha NL, Fazikas L, Medley Q, Debant A, StreuliM. The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions. EMBO J 1995;14:2827-38.

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

Shah J. Cervical lymph node metastasis, its diagnostic, therapeutic and prognostic implications. Oncology 1990;4:61-9.

Shah JP, Cendon RA, Farr HW, Strong EW. Carcinoma of the oral cavity. Factors affecting treatment failure at the primary site and neck. Am J Surg 1976;132(4):504-7.

Shear M, Hawkins DM, Farr HW. The prediction of lymph node metastases from oral squamous carcinoma. Cancer 1976;37:1901–7.

Sires UI, Murphy G, Baragi VM, Fliszar CJ, Welgus HG, Senior RM. Matrilysin is much more efficient than other matrix metalloproteinases in the proteolytic inactivation of a 1-antitrypsin. Biochem Biophys Res Commun 1994;204:613-20.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. Cancer 1953;6:963-8.

Smith BD, Haffty BG, Sasaki CT. Molecular makers in head and neck squamous cell carcinoma: their biological function and prognostic significance. Ann Otol Rhinol Laryngol 2001;110:221-8.

Snijders AM, Schmidt BL, Fridlyand J, Dekker N, Pinkel D, Jordan RC, et al. Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. Oncogene 2005;24(26):4232-42.

Sobin LH, Wittekind C. UICC, International Union Against Cancer, TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002.

Somoza-Martín JM, García-García A, Barros-Angueira F, Otero-Rey E, Torres-Español M, Gándara-Vila P, et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. J Oral Maxillofac Surg 2005;63:786-92.

Soreide K, Janssen EA, Körner H, Baak JP. Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. J Pathol 2006;209(2):147-56.

Sparano A, Quesnelle KM, Kumar MS, Wang Y, Sylvester AJ, Feldman M, et al. Genome-wide profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. Laryngoscope 2006;116(5):735-41.

Speicher MR, Howe C, Crotty P, du Manoir S, Costa J, Ward DC. Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. Cancer Res 1995;55(5):1010–3.

Spiro RH, Huvos AG, Wong GY, Spiro JD, Gnecco CA, Strong EW. Predictive value of tumor thickness in squamous cell carcinoma confined to the tongue and floor of the mouth. Am J Surg 1986;152:345-50.

Stark GR, Debatisse M, Giulotto E, Wahl GM. Recent progress in understanding mechanisms of mammalian DNA amplification. Cell 1989;57:901-8.

Swango PA. Canceres of the oral cavity and pharynx in the United States: an epidemiologic overview. J Public Health Dent 1996;56:309-18.

Tan KD, Zhu Y, Tan HK, Rajasegaran V, Aggarwal A, Wu J, et al. Amplification and Overexpression of PPFIA1, a Putative 11q13 Invasion Suppressor Gene, in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 2008;47(4):353-62.

Takebayashi S, Ogawa T, Jung KY, Muallem A, Mineta H, Fisher SG, et al. Identification of new minimally lost regions on 18q in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res 2000;60(13):3397-403.

Tanimoto H, Underwood LJ, Shigemasa K, Parmley TH, Wang Y, Yan Y, et al. The matrix metalloprotease pump-1 (MMP-7, Matrilysin): A candidate marker/target for ovarian cancer detection and treatment. Tumour Biol 1999;20(2):88-98.

Uchida K, Oga A, Okafuji M, Mihara M, Kawauchi S, Furuya T, et al. Molecular cytogenetic analysis of oral squamous cell carcinomas by comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and fluorescence in situ hybridization. Cancer Genet Cytogenet 2006;167(2):109-16.

Urist MM, O'Brien CJ, Soong SJ. Squamous cell carcinoma of buccal mucosa: analysis of prognostic factors. Am J Surg. 1987;154(4):411-4.

van der Schroeff MP, de Jong RJB. Staging and prognosis in head and neck cancer. Oral Oncol 2009;45:356–60.

van Damme H, Brok H, Schuuring-Scholtes E, Schuuring E. The Redistribution of Cortactin into Cell-Matrix Contact Sites in Human Carcinoma Cells with 11q13

Amplification Is Associated with Both Overexpression and Post-translational Modification. The Journal Of Biological Chemistry 1997;272(11):7374-80.

van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Denkers F, Wishaupt RG, Kummer JA, et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head- and-neck cancer: Methods, reliability, pitfalls, and solutions. Clin Cancer Res 2000;6(10): 3803-16.

van Rossum AG, Moolenaar WH, Schuuring E. Cortactin affects cell migration by regulating intercellular adhesion and cell spreading. Exp Cell Res 2006;312:1658-70.

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Nat Med. 2004;10(8):789-99.

Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA.Matrilysin (MMP-7) promotes invasion of ovarian cancer cells by activation of progelatinase. Int J Cancer 2005;114:19-31.

Weed SA, Parsons JT. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. Oncogene 2001;20(44):6418-34.

Weber RG, Scheer M, Born IA, Joos S, Cobbers JM, Hofele C, et al. Recurrent chromosomal imbalances detected in biopsy material from oral premalignant and malignant lesions by combined tissue microdissection, universal DNA amplification, and comparative genomic hybridization. Am J Pathol 1998;153:295-303.

Weinberg RA. How cancer arises. Sci Am. 1996;275(3):62-70.

Wilson CL, Matrisian LM. Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. Int. J. Biochem. Cell Biol 1996;28:123–36.

Witty JP, McDonell S, Newell K, Cannon P, Navre M, Tressler R, et al. Modulation of matrilysin levels in colon carcinoma cell lines affects tumorigenicity in vivo. Cancer Res 1994;54:4805-12.

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

Wreesmann VB, Singh B. Chromosomal aberrations in squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract: biologic insights and clinical opportunities. J Oral Pathol Med 2005;34(8):449-59.

Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. Biochim Biophys Acta 2006;1773(5):642-52.

Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. Cancer Sci 2005;96(7):379-86.

Yuan G, Qian L, Shi M, Lu F, Li D, Hu M, et al. HER2-dependent MMP-7 expression is mediated by activated STAT3. Cellular Signalling 2008;20(7):1284-91.

Yamamoto H, Adachi Y, Itoh F, Iku S, Matsuno K, Kusano M, et al. Association of Matrilysin Expression with Recurrence and Poor Prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Res 1999;59(14):3313-6.

Yokoyama Y, Grünebach F, Schmidt SM, Heine A, Häntschel M, Stevanovic S, et al. Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells. Clin Cancer Res 2008;14(17):5503-11.

Xia J, Chen Q, Li B, Zeng X. Amplifications of TAOS1 and EMS1 genes in oral carcinogenesis: association with clinicopathological features. Oral Oncol 2007;43(5):508-14.

Zhou X, Temam S, Oh M, Pungpravat N, Huang BL, Mao L, et al. Global Expression-Based Classification of Lymph Node Metastasis and Extracapsular Spread of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. Neoplasia 2006;8(11):925-32.

Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem 1993;39(4):561-77.

APÊNDICE A - Dados clínicos, anátomo-patológicos, seguimento (em meses) e desfecho clínico dos 29 pacientes com carcinoma epidermóide de boca

Caso	Idade	Sexo	Local	T	N	M	Fumo	Álcool	Dif hist	IS	IL	IP	Seguimento	Desfecho
1	43	M	Língua	3	N0	0	sim	sim	MD	Pres	Pres	Aus	50	Sem recorrência
2	48	M	Língua	4	N0	0	sim	sim	BD	Aus	Aus	Pres	21	2ºtumor primário; óbito após 2 meses
3	54	M	Assoalho	3	N0	0	sim	sim	MD	Aus	Aus	Aus	59	Sem recorrência
4	67	M	Assoalho	3	N0	0	sim	sim	BD	Aus	Aus	Aus	45	Sem recorrência
5	40	M	Assoalho	4	N0	0	sim	sim	MD	Aus	Aus	Pres	37	Sem recorrência
6	47	M	Língua	3	N0	0	sim	sim	MD	Aus	Aus	Pres	19	Óbito
7	56	M	Assoalho	4	N0	0	sim	sim	BD	Aus	Aus	Pres	10	Recorrência; óbito após 2 meses
8	63	M	Assoalho	3	N0	0	sim	sim	MD	Aus	Aus	Pres	38	Sem recorrência
9	55	M	Língua	3	N0	0	sim	sim	MD	Aus	Pres	Pres	44	Sem recorrência
10	46	M	Assoalho	1	N+	0	sim	sim	BD	Aus	Pres	Aus	25	Sem recorrência
11	64	M	Assoalho	2	N+	0	sim	sim	MD	Aus	Pres	Pres	14	Sem recorrência
12	49	M	Assoalho	4	N0	0	no pass	sim	BD	Aus	Aus	Pres	5	Óbito
13	55	M	Assoalho	4	N0	0	sim	sim	BD	Aus	Aus	Pres	15	Sem recorrência
14	46	M	Assoalho	3	N0	0	no pass	sim	MD	Aus	Aus	Pres	12	Sem recorrência
15	46	M	Assoalho	2	N+	0	sim	sim	BD	Aus	Aus	Aus	14	Recorrência; óbito após 8 meses
16	41	F	Língua	2	N+	0	no pass	não	MD	Aus	Pres	Aus	16	Óbito
17	56	M	Assoalho	2	N+	0	sim	sim	BD	Aus	Pres	Aus	21	Óbito
18	61	M	Assoalho	2	N+	0	sim	sim	MD	Aus	Aus	Aus	7	Recorrência; óbito após 6 meses
19	59	M	Língua	2	N+	0	sim	sim	BD	Aus	Aus	Aus	10	Recorrência; óbito após 1 mês
20	44	M	Língua	3	N0	0	sim	sim	BD	Aus	Pres	Aus	19	Recorrência; Vivo
21	50	M	Assoalho	1	N+	0	no pass	no pass	BD	Aus	Aus	Aus	70	Sem recorrência
22	51	M	Assoalho	3	N0	0	sim	no pass	MD	Aus	Aus	Pres	67	Sem recorrência
23	75	F	Língua	2	N+	0	no pass	no pass	MD	Aus	Aus	Aus	27	2º tumor primário; Recorrência; Óbito
24	52	M	Língua	2	N+	0	sim	sim	MD	Aus	Aus	Pres	47	Óbito outras causas
25	62	M	Assoalho	3	N0	0	sim	sim	MD	Aus	Aus	Aus	62	Sem recorrência
26	50	M	Língua	2	N+	0	sim	sim	MD	Pres	Pres	Pres	54	Sem recorrência
27	49	M	Língua	2	N+	0	no pass	no pass	BD	Aus	Aus	Aus	47	Sem recorrência
28	52	M	Assoalho	1	N+	0	sim	sim	MD	Aus	Aus	Pres	36	2ºtumor primário; Vivo
29	50	M	Assoalho	2	N+	0	sim	sim	MD	Aus	Aus	Pres	9	Óbito

T: tamanho da neoplasia através análise da peça cirúrgica, N: envolvimento linfonodal patológico, no pass: no passado, Dif hist: diferenciação histopatológica, BD: bem diferenciado, MD: moderadamente diferenciado, IS: infiltração sanguínea, Pres: presente, Aus: ausente, IL: infiltração linfática, IP: infiltração perineural, Seguimento em meses.

ANEXO A – Parecer do CONEP

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1763/2005

Registro CONEP: 12380 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 022/05 **Processo nº 25000.152864/2005-50**
Projeto de Pesquisa: *"Marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço"*.
Pesquisador Responsável: Dr. Francisco Gorgonio da Nóbrega
Instituição: Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos –SP. Laboratório de Genética Molecular e Genomas
Área Temática Especial: Genética Humana

RESUMO:

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é uma das neoplasias mais freqüentes no Brasil. Os pacientes com tumores estáticos precoces geralmente exibem poucos sintomas, o que resulta em atraso no diagnóstico e diminuição de sobrevida. Além disso, lesões histologicamente semelhantes podem apresentar diferentes comportamentos clínicos e respostas ao tratamento. Infelizmente, apesar dos esforços realizados em pesquisa sobre esses tumores e do progresso nas estratégias de detecção precoce e terapia, o seu prognóstico é ainda limitado e a taxa de sobrevida em 5 anos é baixa.

O presente estudo tem como objetivo geral investigar, em carcinoma de cabeça e pescoço, marcadores moleculares de agressividade que possam ser relevantes para prognóstico e terapia. Os objetivos específicos incluem: (1) investigar por técnicas de genômica e proteômica diferenças nos perfis de expressão gênica e protéica entre carcinomas de cabeça e pescoço e tecidos mais correspondentes, e suas relações com parâmetros clínicos e laboratoriais (estágio da doença e evolução); investigar polimorfismos genéticos associados com patrões metabólicos envolvidos na progressão do tumor; validar os marcadores moleculares identificados por meio de PCR quantitativos, imuno-histoquímica e genotipagem em um grande numero de amostras.

Para atingir esses objetivos, será analisado o material coletado na fase piloto do Projeto Genoma Clínico que compreende, até o momento, 295 amostras de tumores e de 239 de margens cirúrgicas procedentes de pacientes bem caracterizados do ponto de vista clínico e de seguimento, além de 460 amostras de sangue de pacientes e 345 de controles.

Os resultados poderão contribuir para o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pelas alterações genéticas que ocorrem durante a progressão tumoral e suas relações com a constituição genética do tecido. Poderão também auxiliar na identificação de padrões metabólicos e de sinalização anormais com potencial para alvos terapêuticos.

O estudo será desenvolvido em três centros , sendo 1500 participantes. Será financiado pela FAPESP e terá a duração de quatro anos.

Cont. Parecer CONEP nº 1763/2005.

COMENTÁRIOS:

Este é um projeto de extensão do projeto "Investigação de Biomarcadores em tumores de Cabeça e Pescoço", submetido e aprovado pela Conep (Processo nº 25000.018584/98-13). Faz parte juntamente com outro projeto tambem aprovado pela Conep (Processo nº 25000.000718/00-46) de um projeto maior denominado "Projeto Genoma Clínico". O projeto de extensão foi enviado a Conep porque acrescentou ao projeto anterior, novos objetivos e outras modalidades de processamento das amostras de tumores (a exemplo SAGE e Microarray). A priori esse projeto não teria necessidade de vir para a Conep, o CEP a que ele foi submetido, juntamente com os projetos anteriores, poderia ter dado o parecer final.

Os TCLEs apresentados, um para sujeitos de pesquisa e outro para o grupo controle, foram adequados os novos objetivos e metodologia, e contemplam os requisitos éticos exigidos na Resolução CNS 196/96 .

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96 manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.
Situação : Projeto aprovado.

OBS: Conforme informação no protocolo, além da Universidade do Vale do Paraíba, o estudo será conduzido nos seguintes centros: Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, Hospital Heliópolis, Faculdade de Medicina da USP e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.
Caso ocorra modificação nessa informação, deve ser comunicada a CONEP.
Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a analise do projeto em questão.

Brasília, 05 de dezembro de 2005.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

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

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

PARECER DE APROVAÇÃO
FR - 234553
Protocolo 231/2008

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU, o protocolo de pesquisa: "**Expressão de transcritos de genes localizados na região 11q13 em carcinomas epidermóides de boca e sua relação com critérios de agressividade**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Flávia Caló de Aquino Xavier e sob orientação do Prof(a). Dr(a). Fábio Daumas Nunes.

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

São Paulo, 11 de dezembro de 2008.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 –Telef./FAX (0XX11) 3091-7887