

SABRINA DANIELA DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE ERBB2, KI-67, USP2a
E ÁCIDO GRAXO SINTASE (FAS) EM CARCINOMAS
ESPINOCELULARES DE BOCA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Estomatopatologia, Área de concentração em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner
Co-Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

**PIRACICABA – SP
2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Si38a	Silva, Sabrina Daniela da. Análise da expressão de ErbB2, Ki-67, USP2a e ácido graxo sintase (FAS) em carcinomas espinocelulares de boca. / Sabrina Daniela da Silva. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007. Orientadores: Edgard Graner, Dirce Maria Carraro. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Carcinoma de células escamosas. 2. Boca – Câncer. 3. Ácidos graxos. 4. Imunohistoquímica. 5. Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa. I. Graner, Edgard. II. Carraro, Dirce Maria. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título. (mg/fop)
-------	--

Título em Inglês: Expression of the ErbB2, Ki-67, USP2a and fatty acid synthase (FAS) in oral squamous cell carcinoma.

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Carcinoma, squamous cell. 2. Mouth cancer. 3.

Fatty acids. 4. Immunohistochemistry. 5. Reverse transcriptase polymerase chain reaction

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Edgard Graner, Alvimar Lima de Castro, Fernando Augusto Soares, L

Data da Defesa: 15-06-2007

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 15 de Junho de 2007, considerou a candidata SABRINA DANIELA DA SILVA aprovada.

Handwritten signature of Prof. Dr. Edgard Graner in black ink.

PROF. DR. EDGARD GRANER

Handwritten signature of Prof. Dr. Alvimar Lima de Castro in blue ink.

PROF. DR. ALVIMAR LIMA DE CASTRO

Handwritten signature of Prof. Dr. Fernando Augusto Soares in blue ink.

PROF. DR. FERNANDO AUGUSTO SOARES

Handwritten signature of Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski in black ink.

PROF. DR. LUIZ PAULO KOWALSKI

Handwritten signature of Prof. Dr. Ricardo Della Coletta in blue ink.

PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

A DEUS

Sem Ele, nada seria possível e não estaríamos aqui reunidos, desfrutando, juntos, destes momentos que nos são tão importantes. Ele se fez presente em todos os momentos firmes e trêmulos transmitindo-me a segurança e a paz necessárias para enfrentar o caminho a seguir. Pela misericórdia e amor, concede-me cada dia, tendo a graça de conviver com minha família, amigos e trabalho.

Ao meu marido **RODOLFO**, por sua dedicação e compreensão em todos os momentos desta e de outras caminhadas. Sempre acreditou em mim ajudando-me a construir os meus sonhos, encorajando-me e abrindo mão de momentos de convívio demonstrando o seu grande amor e paciência.

Aos meus queridos **PAIS** Natalino e Gertrudes e **TODOS AQUELES** que me fizeram **SUA FILHA**: por revestirem minha existência de muito amor, carinho e felicidade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Professor Doutor Edgard Graner**, por ter confiado em mim parte de seu projeto, minha gratidão por tudo que me ensinou e pelo exemplo de profissionalismo, seriedade e simplicidade.

Ao **Doutor Luiz Paulo Kowalski** por estimular e conduzir estudos científicos sobre oncologia, o meu grande respeito e admiração. Agradeço pelas oportunidades a mim creditadas, pela motivação e por ser um grande incentivador da pesquisa científica básica.

A **Doutora Dirce Maria Carraro** pelos momentos de aprendizagem constante e pela grande amizade solidificada ao longo deste trabalho, que, certamente continuará. Obrigada pela paciência, confiança e oportunidade de trabalhar e conviver com todo o grupo.

AGRADECIMENTOS

Esta tese foi construída e realizada com o apoio infinito de muitas pessoas e instituições, dentre as quais gostaria de agradecer especialmente:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) – UNICAMP, na pessoa do diretor, **Professor Doutor Francisco Haiter Neto**.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, São Paulo, na pessoa da diretora, **Professora Doutora Luisa Lina Villa**.

Ao Hospital A.C. Camargo e Fundação Antônio Prudente, São Paulo, na pessoa do diretor **Professor Doutor Ricardo Renzo Brentani**.

Ao Departamento de Diagnóstico Oral da FOP-UNICAMP, seu corpo docente, discente e funcionários, pelo respeito e confiança em mim depositados.

Ao Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital A.C. Camargo pela colaboração e incentivo.

Ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo pela disposição em ajudar e por sugestões primorosas.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Hospital A.C. Camargo sobretudo pela amizade, apoio e ensinamentos.

Aos meus queridos padrinhos que amo muito: **Mario & Tereza e Vanderlei & Sônia** pela torcida constante por minha felicidade.

Aos meus irmãos (**Sueli, Sandro e Sidney**), seus companheiros (as) (**Trigílio, Elaine e Patrícia**) e aos meus sobrinhos (**Hugo, Mateus, Willian, Guilherme, Vinicius, Gabrielly e Danielly**) pelo carinho e por trazerem momentos de alegria em minha vida.

Aos meus sogros **José, Yoneko** e cunhados **Érica e Eduardo** que acreditaram em mim e me ajudaram a estar hoje aqui. Agradeço o carinho e os incentivos dados durante toda a nossa convivência.

Ao professor **Doutor Alvimar Lima de Castro** por ter despertado em mim a paixão e o desejo de estudar doenças de boca. Agradeço a amizade, o carinho e todo incentivo.

À querida amiga **Isabela Werneck da Cunha** pela agradável convivência e valiosa contribuição na realização deste trabalho.

À **Doutora Inês Nobuko Nishimoto** pela realização da estatística deste trabalho.

Aos meus mais que amigos **Nadinha, Cris, Thi e Mari** por morarem no meu coração e por serem responsáveis por muitos dos momentos que me lembrarei com saudades.

À querida **Ana Cristina Amaral Godoy** minha sincera gratidão por ter sido uma grande amiga e muitas vezes uma mãe em todos os momentos que estive em Piracicaba.

Ao querido amigo **Guillermo Martinez Mata** pela imensa amizade que construímos e compartilhamos ao longo do curso e que guardarei para sempre no coração.

Às minhas amigas de longa data **Tânia, Paulinha e Gisele** que mesmo a distância sempre se fazem presente através de mensagens de carinho e apoio.

Aos queridos amigos **Diva & Carnevalli e Jack & Batista** por incentivarem meus sonhos e sonharem comigo. Agradeço o apoio, a torcida e nossa grande amizade.

Aos amigos de **São José dos Campos (Marilena & Arnaldo, Osmarina & Alexandre, Letícia, Isa & Wilton, Darli & Zé, Cris Tengan e enfim...a todos amigos queridos)** pelo companheirismo e incentivo constante.

Aos queridos amigos de **Moema** por todo apoio, carinho, amizade e por cada sorriso, abraço, orações e enfim, por tudo (que é sempre bom) que compartilhamos juntos.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, especialmente aos companheiros de turma **Dawton, Eduardo, Jorge e Michelle** pelos momentos de estudo e diversão.

A toda turma do laboratório de Biologia Molecular, **Aderbal, Adriana, Elen, Elisa, Jane, Laura, Leandra, Louise, Maria Cristina, Mariana, Mev, Nádia, Paulo, Thiago, Waleska e Wilson**, pela convivência e pelos bons momentos vividos dentro e fora do laboratório. Sem vocês, cada um do seu modo, certamente tudo teria sido mais difícil.

Ao **Dr André Vetore** e sua equipe, em especial ao querido amigo **Fabício** pela ajuda inicial com o Real Time e por tantos momentos de auxílio, ensinamentos e dedicação.

Aos funcionários da **Patologia da FOP-UNICAMP**, aos funcionários do **Ludwig** e do Hospital A.C. Camargo, especialmente ao **Laboratório de Biologia Molecular**, **Laboratório de Anatomia Patológica** e ao **Departamento de Cabeça e Pescoço**, onde desenvolvi grande parte deste trabalho. Não tenho palavras para agradecer a amizade, a troca de conhecimentos, o trabalho em equipe, a agradável convivência e indispensável colaboração de todos vocês.

Ao Dr. **Humberto Torloni** e ao Dr. **Fernando Augusto Soares** pela fundação e administração do Banco de Tumores, respectivamente, que foi importante fonte de material para realização deste trabalho.

Ao **André** pela boa vontade e excelente ajuda na localização das amostras do Banco.

Ao **Glauber** e ao **Marcelo** pela ajuda durante a localização dos materiais parafinados.

Aos funcionários **Carlinhos**, **Severino** e **Miuky** pela confecção das lâminas histológicas utilizadas neste estudo.

A secretária do Departamento de Cabeça e Pescoço **Rita** pela amizade, paciência e disposição para ajudar.

A querida **Dona Irdes** e aos demais funcionários do **SAME** (Serviço de Arquivo Médico) pelo auxílio na obtenção dos prontuários. Agradeço também pelas palavras amigas e pelo incentivo e conselhos que sempre me lembrarei com carinho.

A **Suely Francisco** e demais funcionárias da biblioteca da Fundação Antônio Prudente, agradeço por dispensaram sua atenção e tempo comigo. Agradeço pela indispensável colaboração na obtenção do material bibliográfico.

Aos **doentes** e **acompanhantes** que, em meio à dor e, quem sabe, ao maior sofrimento de suas vidas, cooperaram com esta pesquisa.

À **FAPESP** pelo financiamento e à (ao) **parecerista** da FAPESP pelas críticas e palavras de incentivo durante a análise dos relatórios.

Gostaria de agradecer **todas as outras pessoas** que, direta ou indiretamente, ajudaram-me ou que por algum momento me fizeram ainda mais feliz, deixo aqui a minha sincera gratidão. Esse trabalho é o resultado do apoio de todos vocês!

"Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente."

Isaac Newton

Silva SD. **Análise da expressão de ErbB2, Ki-67, USP2a e ácido graxo sintase (FAS) em carcinomas espinocelulares de boca.** Piracicaba, 2007. [Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP].

O sistema ubiquitina (Ub)-proteassomo degrada proteínas intracelulares marcadas com etiquetas de Ub, controlando a disponibilidade destas para a célula. Graner *et al.* (2004) clonaram recentemente USP2a, uma enzima desubiquitinante que interage com ácido graxo sintase (FAS), provocando sua estabilização e protegendo-a da degradação proteassômica, o que aumenta a meia vida desta enzima metabólica. FAS é a principal enzima envolvida na síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa. Nos tecidos normais a síntese é mínima, pois a maior parte dos ácidos graxos utilizados pelas células é proveniente da dieta. Vários trabalhos recentes têm demonstrado que a expressão de FAS está elevada em diversas neoplasias malignas humanas e, em alguns tumores, sua alta expressão foi associada com pior prognóstico. Há poucos estudos sobre a expressão de FAS em carcinomas espinocelulares (CEC) bucais e todos sugerem a sua participação nas etapas iniciais de transformação maligna. Foi demonstrado que FAS é essencial para a proliferação de linhagens celulares de CECs bucais, tumores estes que expressam maior quantidade desta enzima que o epitélio normal adjacente. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos básicos envolvidos no aumento da expressão de FAS em células malignas e seu controle pós-traducional. Recentemente foi demonstrado que ErbB2, um receptor da família ErbB, é capaz de aumentar a expressão de FAS em uma linhagem celular de mama, a qual se torna sensível ao tratamento com bloqueadores da atividade de FAS, entrando em apoptose. Considerando-se o relevante papel biológico de USP2a de proteger FAS da destruição pelo proteassomo e o fato da super-expressão de ErbB2 estar ligada a FAS, o objetivo deste projeto foi estudar a quantidade de RNAs mensageiros provenientes de amostras microdissecadas a

laser e suas proteínas em CECs bucais. Nas amostras avaliadas, ErbB2 exibiu dois padrões bastante distintos de marcação, um localizado na membrana plasmática e o outro intra-citoplasmático. Uma alta porcentagem (97,06%) das células fortemente positivas para FAS foi também intensamente marcada para ErbB2 em membrana plasmática, com correlação positiva estatisticamente significativa ($p = 0,001$) e ambos tiveram associação com o marcador de proliferação celular Ki-67. A positividade para ErbB2 e FAS foi correlacionada com os tumores que apresentaram maior espessura de lesão e comprometimento microscópico dos linfonodos. A intensa expressão de ErbB2 na membrana celular ocorreu em áreas de maior diferenciação celular, enquanto que áreas menos diferenciadas e com maior pleomorfismo celular, a expressão citoplasmática de ErbB2 foi mais evidente. As análises realizadas, por meio de qRT-PCR indicaram que os transcritos USP2a, FAS e ErbB2 estão diferencialmente expressos entre as amostras tumorais de CEC bucal quando comparado ao tecido pareado morfológicamente normal das margens adjacentes e ambos estão estatisticamente correlacionados entre si. Estes resultados mostram que a maioria dos CECs bucais analisados expressa concomitantemente FAS e ErbB2, sugerindo a participação desta última molécula na regulação da expressão gênica de FAS, a qual pode ter um papel biológico na patogênese destas lesões. Além do mais, as proteínas analisadas mostraram ser marcadores moleculares para o prognóstico nestas lesões.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular, câncer bucal, ácido graxo sintase, FAS, isopeptidase, USP2a, ErbB2, imunohistoquímica, qRT-PCR, PCR em tempo real.

Silva SD. **Expression of the ErbB2, Ki-67, USP2a and fatty acid synthase (FAS) in oral squamous cell carcinoma.** Piracicaba, 2007. [Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP].

The ubiquitin (Ub)-proteasome pathway controls cellular protein turnover by degrading targeted intracellular proteins tagged with Ub. Graner *et al.* (2004) demonstrated that the deubiquitinating enzyme USP2a stabilizes and rescues fatty acid synthase (FAS) from proteasomal degradation. FAS plays a central role in *de novo* lipogenesis and is down-regulated in most of the tissues, because cells preferentially use circulating dietary fatty acids for the synthesis of new structural lipids. On the other hand, it has been demonstrated that FAS is highly expressed in several human cancers and in some of them its expression is correlated with poor outcome. Few studies describe FAS expression in oral squamous cell carcinoma (SCC), however, all of them suggest that it is increased at the early stages of malignant transformation. It has been shown that FAS is over-expressed in human oral SCC cell lines and plays an essential role in their proliferation. However, the basic mechanism underlying the control of FAS expression in malignant cells is not known at the moment. It was recently demonstrated that the overexpression of the transmembrane tyrosine kinase receptor ErbB2 is able to increase the expression of FAS in a breast epithelial cell line, which in turn becomes susceptible to apoptosis by FAS inhibition. Considering that USP2a prevents the destruction of FAS through deubiquitination and that ErbB2 overexpression is associated with FAS production, the purpose of the present study was to investigate their mRNA levels by real time PCR in SCC samples and morphologically normal tissue after laser capture microdissection. We also evaluated ErbB2 and FAS protein levels by immunohistochemistry. Two distinct patterns of ErbB2 positivity were identified, a sharply demarcated membrane staining, found in the adjacent normal epithelium

and well differentiated areas of the tumors, and a cytoplasmic reaction observed mainly in undifferentiated cells. Most of the lesions (97.06%) that showed a high expression of FAS were also positive for ErbB2 at the cell membrane ($p=0.001$) and both had correlated with the proliferation marker Ki-67. The immunolabeling for ErbB2 at the cell membrane was also stronger in histologically well differentiated lesions while cytoplasmic positivity was found in undifferentiated tumors. FAS and ErbB2 positivity were associated with microscopic characteristics as thickness and lymphatic embolization of the lesion. Our study also showed a strong positive correlation between ErbB2, FAS and USP2a mRNA expression in the SCC samples compared with normal morphologically tissue of the same source. Taken together, the results presented here show that FAS and ErbB2 are co-expressed in oral SCC and suggest that ErbB2 is able to regulate FAS production in these tumors. Moreover, our data point out that these proteins are significantly associated with a poor prognosis.

Key words: Squamous cell carcinoma, oral cancer, fatty acid synthase, FAS, isopeptidase, USP2a, ErbB2, imunohistochemical, qRT-PCR, Real time PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	do inglês <i>acyl carrier protein</i>
ACTB	do inglês <i>beta-actin</i>
AR	do inglês <i>anfiregulin</i>
ATCC	do inglês <i>american type culture collection</i>
ATP	do inglês <i>adenosine 5'-triphosphate</i>
BCRP	do inglês <i>breakpoint cluster region</i>
BSA	do inglês <i>bovine serum albumin</i>
BTC	do inglês <i>betacellulin</i>
cDNA	do inglês <i>complementary DNA</i>
CEC	carcinoma espinocelular
CT	do inglês <i>cycle threshold</i>
DAB	do inglês <i>diaminobenzidine</i>
DMSO	do inglês <i>dimethylsulfoxide</i>
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic</i>
dNTP	do inglês <i>deoxynucleoside 5' triphosphate</i>
DEPC	do inglês <i>diethylpyrocarbonate</i>
DTT	do inglês <i>1,4-dithiothreitol</i>
DUBs	do inglês <i>deubiquitinating enzymes</i>
EDTA	do inglês <i>ethylenediamine tetraacetate</i>
EGF	do inglês <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>
EPR	do inglês <i>epiregulin</i>
FAS	do inglês <i>fatty acid synthase</i>
FAPESP	Fundação de amparo a pesquisa do estado de São Paulo
FOP	Faculdade de odontologia de Piracicaba
GAPDH	do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HB-EGF	do inglês <i>heparin-binding epidermal growth factor</i>
HPRT	do inglês <i>hypoxanthine phosphoribosyl transferase</i>
HRGs	do inglês <i>heregulin</i>
INCA	Instituto nacional do câncer
kDa	do inglês <i>kilodalton</i>
MAPK	do inglês <i>mitogen activated protein kinase</i>
MgCl ₂	do inglês <i>magnesium chloride</i>
NRG	do inglês <i>neuregulin</i>
PBS	do inglês <i>phosphate bufferes saline</i>
PCR	do inglês <i>polimerase chain reaction</i>
PCNA	do inglês <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PI3K	do inglês <i>phosphatidylinositol-3 kinase</i>
RA	do inglês <i>androgen receptor</i>
RNA	do inglês <i>acid ribonucleic</i>

RNAse	do inglês <i>ribonuclease</i>
rpm	do inglês <i>rotation per minute</i>
RT-PCR	do inglês <i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SCC	do inglês <i>squamous cell carcinoma</i>
SRE	do inglês <i>sterol regulatory element</i>
SREBP	do inglês <i>sterol regulatory element binding protein</i>
TGF- α	do inglês <i>transforming growth factor α</i>
TNM	do inglês <i>tumor node metastasis</i>
Ub	ubiquitina
UBP	do inglês <i>ubiquitin processing proteases</i>
UCH	do inglês <i>ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases</i>
UICC	União Internacional Contra o Câncer
USP	do inglês <i>ubiquitin specific proteases</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1. Epidemiologia e fatores de risco para o câncer	3
2.2. Características clínicas e histopatológicas do CEC bucal	5
2.3. A oncoproteína ErbB2	7
2.3.1. As vias de sinalização ativadas pela oncoproteína ErbB2	9
2.3.2. Significado clínico da oncoproteína ErbB2 no câncer	11
2.4. Ácido graxo sintase (FAS)	13
2.4.1. Significado clínico da expressão de FAS no câncer	15
2.4.2. Regulação da expressão de FAS	17
2.4.3. FAS como alvo terapêutico	20
2.5. O sistema ubiquitina (Ub)-proteassomo	22
2.6. As enzimas desubiquitinantes (DUBs) ou isopeptidases	25
2.6.1. A isopeptidase (ou enzima desubiquitinante) USP2a	26
3. Proposições	29
4. Material e Métodos	31
4.1. Amostras estudadas	31
4.2. Análise histopatológica	31
4.3. Reações imunohistoquímicas (IHQ)	32
4.4. Microdissecção a <i>laser</i>	34
4.5. Extração de RNA total	34
4.6. Amplificação do RNA	35
4.7. Avaliação da qualidade e quantidade das amostras provenientes de LCM	36
4.8. Análise do nível de expressão por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)	37
4.8.1. RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)	37
4.8.2. Padronização das concentrações de cDNA e de <i>primers</i>	38
4.8.3. Cálculo da eficiência de amplificação (E)	38
4.8.4. Seleção dos genes normalizadores	39
4.8.5. Análise da expressão gênica	41
4.9. Análises Estatísticas	41
5. Resultados	43
5.1. Características clínicas e epidemiológicas da amostra estudada	43
5.2. Características histopatológicas	45
5.3. Tipos de tratamento recebido pelos pacientes	46
5.4. Presença de recorrências locais e metástases	49
5.5. Análises imunohistoquímicas	49
5.5.1. Expressão de FAS	50
5.5.2. Expressão de ErbB2	52
5.5.3. Expressão de Ki-67	52
5.6. Correlações de frequência	53

5.7. Situação clínica dos pacientes até a data da última informação obtida	55
5.8. Tempo de sobrevida global	55
5.9. Tempo de sobrevida livre de doença	61
5.10. Obtenção das amostras microdissecadas a <i>laser</i>	67
5.10.1. Qualidade e quantidade das amostras de tecidos obtidas por microdissecção a <i>laser</i>	69
5.11. qRT-PCR	69
5.11.1. Padronizações das concentrações de cDNA e de <i>primers</i>	70
5.11.2. Eficiência dos <i>primers</i> e especificidade dos fragmentos	70
5.11.3. Escolha do normalizador ou gene referência	73
5.11.4. Expressão dos RNAs mensageiros de FAS, ErbB2 e USP2a em amostras pareadas de CECs e tecido epitelial oral morfológicamente normal por qRT-PCR	75
6. Discussão	79
7. Conclusão	87
Referências	89
Anexos	107
1. Ficha clínica para coleta de dados dos pacientes	107
2. Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP	109
3. Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital AC Camargo	111
4. Protocolo para extração de RNA	113
5. Protocolo para amplificação do RNA mensageiro	115
6. Artigo: Fatty acid synthase (FAS) expression in oral squamous cell carcinoma of the tongue: clinicopathological findings	119
7. Artigo: ErbB2 and Fatty Acid Synthase (FAS) expression in squamous cell carcinoma of the tongue: Correlation with clinical outcomes	129
8. Artigo: Expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in morphologically normal, premalignant and malignant oral keratinocytes	139

1. INTRODUÇÃO

Carcinomas são neoplasias malignas de origem epitelial caracterizadas pelo crescimento descontrolado e disseminação de suas células, que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Sua origem é complexa, sendo causados por alterações genéticas geralmente associadas aos fatores ambientais (Line *et al.*, 1995; Coletta *et al.*, 2002). Das neoplasias malignas que ocorrem na boca, o carcinoma espinocelular (CEC), também denominado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, é a enfermidade mais freqüente e de etiologia multifatorial (Llewellyn *et al.*, 2001). Não há um carcinógeno isolado, mas fatores intrínsecos e extrínsecos que, em conjunto, provocam a transformação maligna do epitélio escamoso queratinizado ou não queratinizado que reveste a cavidade bucal (Neville *et al.*, 1998). A incidência do câncer cresce no Brasil, como em todo mundo, num ritmo que acompanha o aumento da expectativa de vida e apesar dos avanços nas técnicas de diagnóstico e nos tratamentos, esta doença continua com altas taxas de mortalidade e morbidade (Ministério da Saúde, 2007). O conhecimento detalhado da patogênese do CEC bucal e a identificação de marcadores biológicos clinicamente eficazes podem fornecer informações úteis na determinação do prognóstico e individualização dos tratamentos.

Recentemente foi demonstrado que ErbB2, um receptor da família ErbB, é capaz de aumentar a expressão da enzima ácido graxo sintase (FAS) em uma linhagem celular derivada da glândula mamária, a qual se torna sensível aos bloqueadores da atividade de FAS, entrando em apoptose (Kumar-Sinha *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2004a). FAS é a principal enzima envolvida na síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa. Nos tecidos normais sua atividade é mínima, pois a maior parte dos ácidos graxos utilizados pelas células é proveniente da dieta (Jayakumar *et al.*, 1995; Chirala *et al.*, 1997; Kuhajda, 2000; Brink *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2004). Em condições fisiológicas, FAS participa de processos biológicos como o armazenamento de energia, a produção

de ácidos graxos durante a lactação e a síntese de membranas celulares (Weiss *et al.*, 1986; Kuhajda, 2000; Kuhajda *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003). Porém, trabalhos recentes têm demonstrado que a expressão de FAS está elevada em diversas neoplasias malignas humanas e, em alguns destes tumores, isto está associado a um pior prognóstico (Shurbaji *et al.*, 1996; Kuhajda, 2000; Piyathilake *et al.*, 2000; Myers *et al.*, 2001; Dhanasekaran *et al.*, 2001; Takahiro *et al.*, 2003; Visca *et al.*, 2003; Baron *et al.*, 2004).

O sistema ubiquitina (Ub)-proteassomo degrada proteínas intracelulares marcadas com etiquetas de Ub (Spataro *et al.*, 1998). Graner *et al.* (2004) clonaram USP2a, uma enzima desubiquitinante que interage com FAS, provocando sua estabilização e protegendo-a da degradação proteassômica, o que aumenta a sua meia vida intracelular. FAS parece ser essencial para a proliferação de linhagens celulares de CECs bucais, pois estes tumores expressam FAS em maior quantidade que o epitélio normal adjacente. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos básicos envolvidos no aumento da expressão da FAS em células malignas e seu controle pós-traducional. Considerando-se o relevante papel biológico de USP2a de proteger FAS da destruição pelo proteassomo e o fato da super-expressão de ErbB2 estar ligada a FAS, este projeto tem objetivo de avaliar estas moléculas através da mensuração da quantidade de RNAs mensageiros provenientes de amostras congeladas microdissecadas a *laser* e também de seus respectivos produtos protéicos, em CECs bucais tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo. As taxas de expressão destas moléculas foram também correlacionadas com os dados clínicos e histopatológicos de cada paciente da nossa amostra.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Epidemiologia e fatores de riscos para o câncer

A “*American Cancer Society*” estimou que um a cada três americanos vivos desenvolveria uma malignidade em algum ponto do seu organismo (Neville *et al.*, 1998). A incidência de câncer é muito variável ao redor do mundo, acometendo tanto países desenvolvidos como aqueles em desenvolvimento (Moore *et al.*, 2000; Wünsch-Filho, 2002). Parkin *et al.* (2001) estimaram que, na virada do milênio, o número de novos casos de câncer em todo o mundo seria maior que 10 milhões, dentre os quais, 53% ocorreriam nos países em desenvolvimento. A União Internacional Contra o Câncer (UICC) (2005) estima a ocorrência de 15 milhões de novos casos de câncer no mundo no ano de 2020 (Ministério da Saúde, 2007). Atualmente, os tumores de pulmão (902.000) e próstata (543.000) são os mais freqüentes no gênero masculino, enquanto que no gênero feminino as maiores ocorrências correspondem aos tumores de mama (1.000.000) e colo do útero (471.000) (Ministério da Saúde, 2007).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), foi estimado que em 2006 ocorreriam 472.050 casos novos de câncer, sendo esperados 234.570 casos novos para o gênero masculino e 237.480 casos novos para o gênero feminino. O tipo de câncer mais incidente na população brasileira seria o câncer de pele não melanoma (116.000), seguido pelos tumores de mama feminina (49.000), próstata (47.000), pulmão (27.000), cólon e reto (25.000), estômago (23.000) e colo do útero (19.000). Os tumores mais incidentes no gênero masculino seriam os cânceres de pele não melanoma (55.000), próstata (47.000), pulmão (18.000), estômago (15.000) e cólon e reto (11.000). Para o gênero feminino destacam-se os tumores de pele não melanoma (61.000), mama (49.000), colo do útero (19.000), cólon e reto (14.000) e pulmão (9.000) (Ministério da Saúde, 2007).

O câncer de boca corresponde ao sexto tipo mais freqüente na população mundial, sendo a maior parte nos países em desenvolvimento. A mais alta

incidência ocorre na Índia, França, sul e sudeste asiáticos (Lopes *et al.*, 2005). Segundo dados do INCA, estima-se a ocorrência de 13.470 casos novos de câncer bucal, sendo que o tipo histológico mais comum é o carcinoma espinocelular (CEC), que representa cerca de 95% de todos os tumores malignos da boca (Ministério da Saúde, 2007). No Brasil, as taxas de incidência e de mortalidade por câncer de boca em São Paulo classificam-se entre as mais altas do mundo (8/100.000) (Kowalski *et al.*, 2003). O CEC de boca é um dos seis tipos de neoplasias malignas que mais acometem homens e o oitavo mais comum nas mulheres (Ministério da Saúde, 2007). Os portadores desta entidade são frequentemente indivíduos do gênero masculino na faixa etária superior a 50 anos (Zakrzewska, 1999; Coletta *et al.*, 2002; Kowalski *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2005). Apesar da relativa facilidade de detecção precoce desta doença, a maioria dos casos é diagnosticada nos estádios mais avançados. De acordo com o Ministério da Saúde, menos de 1% dos casos de CEC bucal são detectados precocemente, ainda como carcinoma *in situ*, quando é possível obter a cura sem maiores prejuízos estéticos e funcionais ao paciente. A maioria dos casos (cerca de 60%) é diagnosticada em estádios avançados, quando a lesão é destrutiva e infiltrativa, os linfonodos palpáveis e o prognóstico invariavelmente sombrio (Ministério da Saúde, 2003; Lopes *et al.*, 2005). Cerca de metade dos pacientes já apresentam metástases regionais no momento do diagnóstico, o que contribui para reduzir a sobrevida, que é de aproximadamente 50% após um período de cinco anos e geralmente acompanhada de graves seqüelas estéticas e funcionais (Lopes *et al.*, 1998; Kowalski *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2005).

Vários fatores estão envolvidos na origem destes tumores, incluindo predisposição genética, hábitos e condições sociais e atividade profissional (Lopes *et al.*, 2005). O desenvolvimento desta doença é um processo multifatorial relacionado com o acúmulo de alterações genéticas, particularmente nos genes que regulam o crescimento, a diferenciação e morte celular, a estabilidade, o reparo do DNA e a imunidade celular e humoral (Scully, 1993, Line *et al.*, 1995, Schoelch *et al.*, 1999, Coletta *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2005). Estas alterações

genéticas podem ser mutações espontâneas, de caráter hereditário ou não, ou provocadas por fatores externos ou epigenéticos, como diversos agentes carcinogênicos químicos, biológicos ou físicos (Kowalski *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2005). O acúmulo destas alterações determinará o perfil da progressão tumoral, pois, a ativação ou superexpressão de oncogenes, e a inativação ou subexpressão de genes supressores de tumor produzem vantagens seletivas para a população clonal de células (Califano *et al.*, 1996; Scully *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2006).

Os riscos mais significativos para o CEC de boca estão associados aos fatores ambientais, dentre os quais se destacam o consumo de tabaco e bebidas alcoólicas (Franco *et al.*, 1989; Smith, 1989; Johnson & Warnakulasuriya, 1993; Andre *et al.*, 1995; Macfarlane *et al.*, 1996; Zakrzewska, 1999; Schlecht *et al.*, 1999; Ogden, 2005). Parece existir uma relação entre a dose e o tempo de exposição aos carcinógenos encontrados no cigarro e no álcool e o desenvolvimento do CEC bucal, sendo o risco potencializado nas pessoas que fumam e também consomem bebidas alcoólicas (Franco *et al.*, 1989; Line *et al.*, 1995; Schlecht *et al.*, 1999; Znaor *et al.*, 2003).

2.2. Características clínicas e histopatológicas do CEC bucal

O CEC bucal apresenta-se clinicamente como uma massa exofítica, com ou sem ulceração, de aspecto leucoplásico, eritroplásico ou eritroleucoplásico e bordas geralmente irregulares, endurecidas e elevadas. No início é indolor, havendo sintomatologia quando a lesão apresenta-se ulcerada, com invasão da musculatura ou de nervos. Outros sintomas mais tardios são sialorréia, sangramentos, mobilidade dentária, halitose, trismo, disfagia, emagrecimento e linfonodos metastáticos (Neville *et al.*, 1998; Zakrzewska, 1999; Kowalski *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2005). As lesões ocorrem mais comumente no gênero masculino, predominando na sexta e sétima décadas de vida (Moore *et al.*, 2000; Llewellyn *et al.*, 2001; Wünsch-Filho, 2002). O local mais comum de envolvimento do CEC é a língua (40%), seguida pelo assoalho bucal (20%) (Neville *et al.*, 1998;

Kowalski *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2005). Outros locais são também afetados, como gengiva, rebordo alveolar, palato mole e mucosa jugal, porém, com menor frequência.

Do ponto de vista microscópico, o CEC é caracterizado por uma proliferação de células pleomórficas, com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e figuras de mitoses atípicas. O tecido em crescimento invade o tecido conjuntivo subjacente, formando ninhos ou ilhas epiteliais (Neville *et al.*, 1998). Focos de células queratinizadas isoladas e pérolas de queratina podem também ser observados. De acordo com a diferenciação celular, os CECs são classificados em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco ou pobremente diferenciados, dependendo do grau de queratinização, polimorfismo nuclear, número de mitoses, padrão de invasão dos tecidos adjacentes, estágio de invasão e intensidade de infiltrado inflamatório (Anneroth *et al.*, 1987). Os CECs bem diferenciados assemelham ao tecido epitelial escamoso normal, apresentando um padrão sólido, contendo proporções variadas de células escamosas e basais, com evidente queratinização e poucas figuras de mitose. Os CECs moderadamente diferenciados apresentam células espinhosas bem evidentes e com acentuado pleomorfismo nuclear, maior número de mitoses (incluindo as atípicas), hipercromatismo, nucléolos bem evidentes e poucas pérolas de queratina, embora a queratinização de células individuais possa ser observada. As lesões pobremente diferenciadas têm pouca ou nenhuma evidência de queratinização, as células neoplásicas mostram alto grau de pleomorfismo e hipercromatismo, com um crescimento difuso e elevado potencial mitótico (Anneroth *et al.*, 1987).

A via de disseminação metastática mais freqüente para estes tumores é através da embolização linfática para linfonodos regionais. O potencial de metastatização depende do estadiamento TNM, do grau de diferenciação histológica, do local do tumor e das suas dimensões, principalmente a espessura microscópica da lesão (Lopes *et al.*, 2005). Os linfonodos mais comumente acometidos em tumores de boca são os grupos jugular alto e submandibular

homolaterais. Metástase a distância é pouco freqüente e geralmente associada à extensão regional da doença (Lopes *et al.*, 2005). Os pacientes portadores de CEC bucal têm um risco aumentado de desenvolvimento de um segundo tumor primário, sincrônico ou metacrônico, sendo as vias aerodigestivas superiores, o esôfago e o pulmão os locais mais frequentemente acometidos (Lopes *et al.*, 2005). O conhecimento detalhado da patogênese desta doença e a identificação de marcadores biológicos clinicamente eficientes podem fornecer informações úteis na determinação do prognóstico e individualização do tratamento.

2.3. A oncoproteína ErbB2

Receptores com atividade de tirosina-quinase atuam como mediadores primários no processo de sinalização celular, regulando a progressão do ciclo celular, o rearranjo do citoesqueleto, a diferenciação celular e a apoptose (Casalini *et al.*, 2004; Roskoski, 2004). A sub-classe I desta super-família é constituída por quatro membros: EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 e ErbB4/HER4 (O-charoenrat *et al.*, 2002; Holbro *et al.*, 2003). Todos estes receptores possuem um domínio de ligação extracelular rico em cisteína, contendo sítios catalíticos que podem ser glicosilados, um domínio transmembrânico e um domínio citoplasmático contendo resíduos de tirosina (Figura 1).

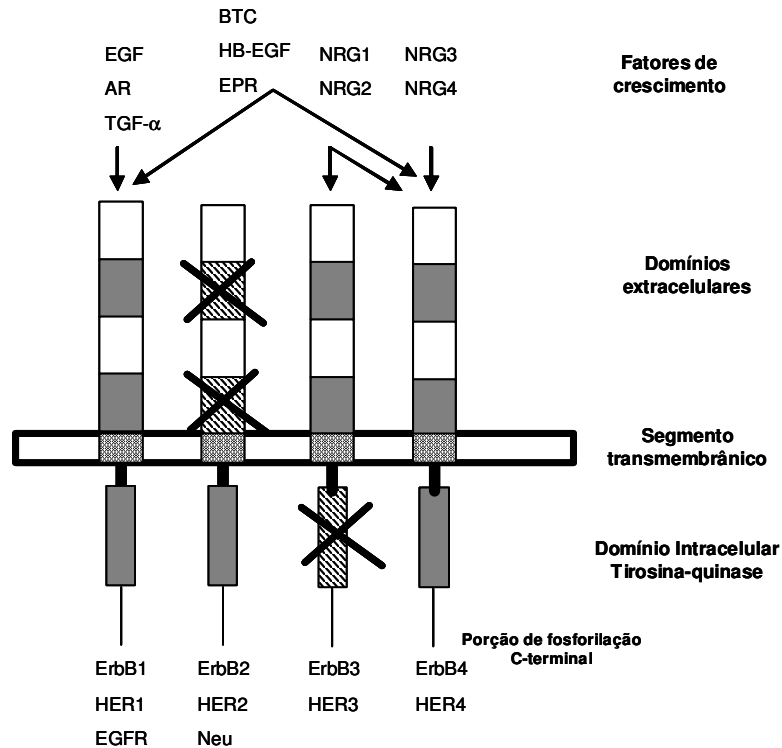


Figura 1: Representação esquemática dos receptores de superfície celular ErbB. A família é constituída por EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 e ErbB4/HER4. Cada receptor é constituído por uma porção extracelular (domínios I, II, III e IV), um segmento transmembrânico e um domínio intracelular com atividade de tirosina-quinase. A inativação dos domínios de ligação para ErbB2 e a inativação do domínio tirosina-quinase do ErbB3 estão indicados na figura com um X.

Fonte: Modificado de Roskoski (2004).

Os ligantes da família ErbB são produtos de genes distintos e consistem em mais de 30 membros, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), anfiregulina (AR), fator de crescimento semelhante a EGF – ligante de heparina (HB-EGF), betacelulina (BTC), epiregulina (EPR), além de diversas variantes de heregulinas (HRGs), também conhecidas como neuregulinas (NRG) (O-charoenrat *et al.*, 2002). O único receptor que não possui ligante específico é o ErbB2 (Figura 1), que age de forma sinérgica com os demais receptores (Penuel *et al.*, 2001; O-charoenrat *et al.*, 2000; O-charoenrat *et al.*, 2002; Roskoski, 2004).

O gene que codifica a proteína ErbB2 está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q12-q21) e codifica uma glicoproteína transmembrânica de

185 kDa com atividade de tirosina-quinase em sua porção carboxi-terminal (Popescu *et al.*, 1989). Esta proteína, constituída por 1255 aminoácidos, apresenta alto grau de similaridade com outros membros da família dos receptores tirosina-quinase (Xie *et al.*, 2000; Rabindran, 2005), porém, a região que contém o sítio de interação com o ligante está mutada ou obstruída (Roskoski 2004) (Figura 1). Esta estrutura peculiar de ErbB2 explica por que este receptor é parceiro preferencial de outros membros da família, formando heterodímeros capazes de causar intensa e prolongada ativação das vias de sinalização intracelular (Penuel *et al.*, 2001; O-charoenrat *et al.*, 2000; O-charoenrat *et al.*, 2002; Holbro *et al.*, 2003; Roskoski, 2004).

2.3.1. Vias de sinalização ativadas pela oncoproteína ErbB2

Uma vez que os receptores da família ErbB são ativados, ocorre dimerização, auto-fosforilação e fosforilação cruzada de resíduos específicos de tirosina do domínio citoplasmático, os quais levam ao recrutamento de diversas proteínas que desencadeiam uma cascata de reações e estimulam múltiplas vias de sinalização, como as vias MAPK (*mitogen activated protein kinase*) e PI3K (*phosphatidylinositol-3kinase*) (Figura 2) (Casalini *et al.*, 2004). A ativação destas vias resulta em fosforilação de fatores de transcrição que controlam processos fundamentais da célula (Figura 2) (Yarden, 2001; O-charoenrat *et al.*, 2002, Kumar-Sinha *et al.*, 2003; Holbro *et al.*, 2003; Casalini *et al.*, 2004). Por este motivo, o oncogene ErbB2 é um importante alvo terapêutico para tratamento do câncer (Hynes & Lane, 2005; Rabindran, 2005).

A ativação de ErbB2 promove a fosforilação dos seus resíduos de tirosina da porção intracelular que atuam como sítios de ligação para os domínios SH2 presentes nas moléculas de sinalização intracelular, como a proteína citoplasmática adaptadora Grb2. Esta proteína, por sua vez, recruta SOS que, em seguida, ativa RAS, pela conversão de GDP-GTP. RAS se liga a RAF, ocasionando a fosforilação de MEK1/2 (MAPKK) e de ERK1/2 (MAPK) (Figura 2) (Liu *et al.*, 1992; Revillion *et al.*, 1998; Orr *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2000; Yamauchi

et al., 2001; Casalini *et al.*, 2004). Em seguida, ERK1/2 (MAPK) fosforila proteínas citoplasmáticas e sofre translocação para o núcleo, onde promove fosforilação e ativação de fatores de transcrição (Figura 2) (Olayioye, 2001).

A via de sinalização PI3K é modulada pela ativação do receptor ErbB2. Após a estimulação desta via, a proteína mTOR, que regula a disponibilidade de energia e nutrientes para a célula, é modulada e gera um aumento de síntese de substratos que são translocados para o núcleo onde estão envolvidos com regulação da proliferação e sobrevivência celular, resistência a apoptose, metabolismo, angiogênese e motilidade celular. Assim, as vias PI3K e MAPK têm papel central na proliferação, sobrevivência, diferenciação, apoptose, invasão e metástase em neoplasias malignas humanas (Michl & Downward, 2005).

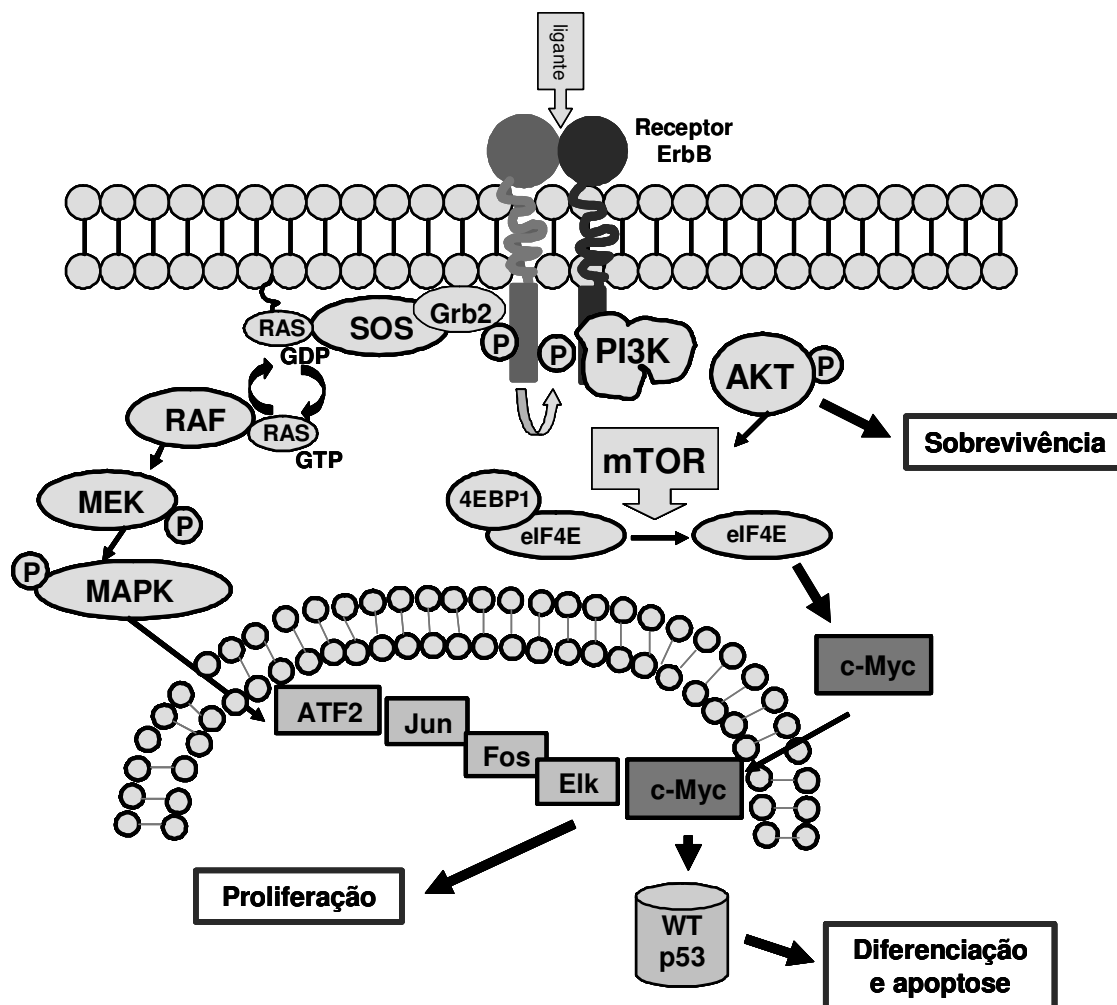


Figura 2: Representação esquemática das principais vias de sinalização celular desencadeadas pela ativação do receptor ErbB2.

Fonte: Modificado de Casalini *et al.* (2004).

2.3.2. Significado clínico da oncoproteína ErbB2 no câncer

Diversos estudos têm demonstrado associação entre ErbB2 e câncer. Nas células tumorais humanas, o principal mecanismo de ativação de ErbB2 é a amplificação gênica, frequentemente associada a super-expressão da proteína ErbB2, o que perpetua sinais que estimulam a divisão celular (Liu *et al.*, 1992; Revillion *et al.*, 1998; O-charoenrat *et al.*, 2000; Penuel *et al.*, 2001; O-charoenrat *et al.*, 2002; Holbro *et al.*, 2003). Entretanto, a super-expressão da proteína pode ocorrer sem a ocorrência de amplificação gênica (Karunagaran *et al.*, 1996, Revillion *et al.*, 1998).

ErbB2 é um dos mais bem caracterizados oncogenes e está amplificado e/ou super-expresso em aproximadamente 30% dos tumores de mama e ovário (Slamon *et al.*, 1987; Isola *et al.*, 1999). A expressão aumentada de ErbB2 nestes tumores tem sido positivamente associada a um fenótipo agressivo e pior prognóstico (Eccles, 2001; Menard *et al.*, 2001; Pritchard *et al.*, 2006), ou seja, menor tempo livre da doença e menor sobrevida total do paciente após o tratamento. Além disto, diversas linhas de pesquisa têm sugerido que as pacientes com câncer de mama que apresentam super-expressão de ErbB2 não respondem aos tratamentos convencionais (Slamon *et al.*, 1987; Albanell *et al.*, 1996; Khademi *et al.*, 2002).

Assim, novas abordagens terapêuticas que visam combater células que super-expressam ErbB2 estão sendo desenvolvidas (Revillion *et al.*, 1998; Zhou & Hung, 2003). Dos principais inibidores, os anticorpos monoclonais humanizados contra ErbB2 (Trastuzumab) e as moléculas inibidoras da atividade de tirosina-quinase têm se mostrado eficientes no tratamento dos casos de câncer de mama que expressam altas quantidades de ErbB2, causando regressão tumoral em cerca de 20% dos casos (Baselga *et al.*, 1996; Yarden, 2001; Hortobagyi, 2005; Hynes & Lane, 2005; Rabindran, 2005).

O conhecimento dos mecanismos de sinalização ativados pela super-expressão do receptor ErbB2 tem permitido importante progresso no tratamento do câncer de mama. Porém, a alta expressão de ErbB2 também tem sido relatada

em carcinomas de esôfago, estômago, pulmão, cólon, pâncreas, bexiga e cabeça e pescoço (Hou *et al.*, 1992; Ibrahim *et al.*, 1997; Wilkman *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1999; O-charoenrat *et al.*, 2000; Werkmeister *et al.*, 2000; Bei *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002; O-charoenrat *et al.*, 2002; Pinto-de-Sousa *et al.*, 2002; Albuquerque *et al.*, 2003; Ueda *et al.*, 2004; Eissa *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2005; Mimura *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2006; Metges *et al.*, 2006). Apesar de ainda bastante controversa, a literatura sugere fortemente que a amplificação do gene que codifica ErbB2 associada aos níveis aumentados desta proteína em CECs bucais desempenha um papel na patogênese e progressão desta neoplasia (Hou *et al.*, 1992; Xia *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1999; Werkmeister *et al.*, 2000; Bei *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004; Agostini *et al.*, 2004).

Uma conexão molecular entre a proteína ErbB2 e a enzima lipogênica ácido graxo sintase (FAS), foi evidenciada pelo aumento de expressão do gene que codifica FAS em uma linhagem celular derivada de glândula mamária (H16N2), após a expressão forçada e estável de grandes quantidades de ErbB2 (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Posteriormente, foi também demonstrado que a super-expressão de ErbB2 em fibroblastos de camundongos estimulam a expressão da proteína FAS através da via PI3K e MAPK (Menendez *et al.*, 2004a; Menendez *et al.*, 2005a). Menendez *et al.* (2004b) comprovaram que a inibição de FAS, através de inibidores farmacológicos ou mediada por RNA de interferência, regula negativamente a expressão de ErbB2 em linhagens celulares de carcinomas de mama e ovário. Em nosso trabalho de mestrado (Silva *et al.*, 2004) encontramos correlação estatisticamente significativa entre a expressão de ErbB2 e de FAS em CECs de cabeça e pescoço, através de reações imunohistoquímicas. Assim, levando-se em consideração todos os indícios da participação de ErbB2 na etiologia do CEC da região de cabeça e pescoço e as evidências do papel de FAS na patogênese de neoplasias malignas, um dos objetivos do presente trabalho foi verificar uma possível correlação entre a expressão gênica e imunohistoquímica de ErbB2 e FAS em uma população de células homogêneas nestes tumores.

2.4. Ácido graxo sintase (FAS)

Ácido graxo sintase (“Fatty Acid Synthase” – FAS ou EC.2.3.1.85) é uma enzima metabólica multifuncional com papel central na biossíntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa, a partir dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA (Jayakumar *et al.*, 1995; Chirala *et al.*, 1997; Kuhajda, 2000; Brink *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2004). A proteína FAS é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas idênticas, com 250 a 270 kDa cada, contendo sete sítios catalíticos distintos organizados em sequência e um sítio para a proteína carregadora de acil (ACP), distribuídos em três domínios (Figura 3) (Wakil, 1989; Chirala *et al.*, 2001; Brink *et al.*, 2002).

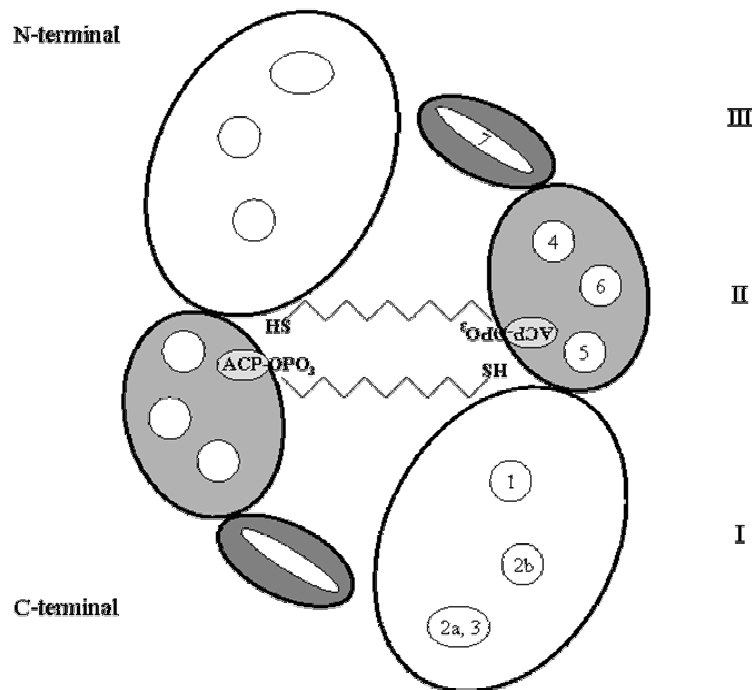


Figura 3: Representação esquemática da estrutura de FAS. Os sítios catalíticos estão distribuídos a partir da extremidade amino-terminal em direção a carboxil-terminal na seguinte ordem: Domínio I – (1) acetil-CoA transacilase, (2b) malonil-CoA transacilase, (2a,3) β -cetoacil sintase; Domínio II – (4) β -cetoacil redutase, ACP, (5) β -hidroxiacil desidratase, (6) enoil redutase; Domínio III – (7) palmitoil tioesterase. ACP –proteína carregadora de acil.

Fonte: Modificado de Paselk (1997).

O domínio I funciona como sítio de entrada dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA para a subsequente reação de condensação. O domínio II é o redutor, no qual o produto formado pela elongação da cadeia é reduzido e o domínio III é responsável pela hidrólise e liberação da molécula de ácido graxo recém sintetizada (Figura 3) (Wakil, 1989). Para a produção dos ácidos graxos é necessária a atividade das enzimas acetil-CoA carboxilase, que sintetiza malonil-CoA, citrato liase, que sintetiza acetil-CoA, assim como da enzima málica e da via das pentoses fosfato, que produzem NADPH, que atua como agente redutor. FAS, por sua vez, catalisa a reação de condensação de malonil-CoA e acetil-CoA, formando como produto principal o ácido graxo saturado de 16 carbonos palmitato, que pode ser modificado em miristato e estereato (Kuhajda, 2000; Chirala *et al.*, 2001).

Em condições normais, a síntese endógena de ácidos graxos é mínima, exceto em tecidos lipogênicos, como o adiposo e o fígado, pois a maioria das células humanas normais utiliza os lipídios da dieta (Weiss *et al.*, 1986; Kuhajda, 2000; Kuhajda *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003). FAS é importante para inúmeros processos biológicos, como armazenamento de energia, produção de ácidos graxos durante a lactação, proliferação do endométrio e dos tecidos fetais, síntese das membranas celulares e tem função regulatória na síntese de hormônios e mensageiros intracelulares (Figura 4) (Semenkovich, 1997; Chirala *et al.*, 1997; Kuhajda, 2000; Chirala *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003). Além do mais, a atividade de FAS fornece energia pela oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias (Baron *et al.*, 2004).

Apesar da síntese endógena de FAS ser baixa em tecidos normais, sua atividade é fundamental. Foi demonstrado, através da construção de camundongos “*knockout*” para o gene que codifica a enzima FAS (*FASN*), que os homozigotos nulos para FAS (*FASN* $-/-$) morrem antes mesmo de sua implantação no útero, enquanto que a maioria dos heterozigotos (*FASN* $+/-$) morrem no útero, mesmo na presença de uma dieta rica em ácidos graxos saturados (Chirala *et al.*, 2003). Estes resultados são importantes, pois mostram

claramente que a síntese endógena de ácidos graxos é essencial para a embriogênese, período caracterizado por intensa proliferação e diferenciação celular. Além do mais, este fato sugere que eventuais terapias para o câncer baseadas na inibição da atividade de FAS podem ser teratogênicas.

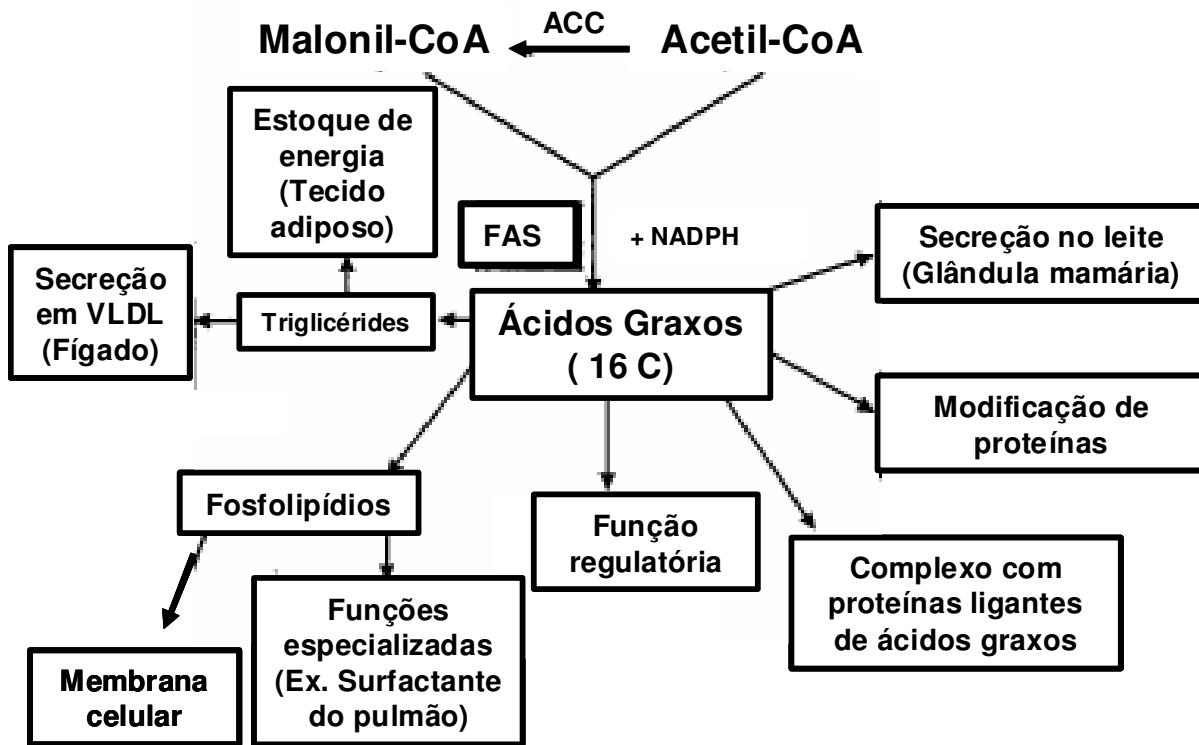


Figura 4: Representação esquemática dos destinos dos ácidos graxos produzidos pela FAS. ACC representa a acetil-CoA-carboxilase.

Fonte: Modificado de Semenkovich (1997).

2.4.1. Significado clínico da expressão de FAS no câncer

Em 1953, Medes *et al.* sugeriram pela primeira vez que a síntese de ácidos graxos estaria aumentada nos tecidos tumorais. De fato, nas células malignas, a maior parte dos ácidos graxos é proveniente da biossíntese endógena e independente do suprimento nutricional, ao contrário da maioria das células normais que utilizam os lipídios da dieta (Sabine & Abraham, 1967; Ookhtens *et al.*, 1984; Weiss *et al.*, 1986; Baron *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005b). FAS está presente em grandes quantidades em diversos tipos de neoplasias malignas humanas, como as de mama (Pizer *et al.*, 1996a; Milgram *et al.*, 1997; Oskouian,

2000; Wang *et al.*, 2001), ovário (Pizer *et al.*, 1996b; Alo *et al.*, 2000), próstata (Epstein *et al.*, 1995; Shurbaji *et al.*, 1996; Swinnen *et al.*, 1997; Swinnen *et al.*, 2000; Bull *et al.*, 2001; Dhanasekaran *et al.*, 2001; Welsh *et al.*, 2001; Swinnen *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003), endométrio (Pizer *et al.*, 1998a), tireóide (Vlad *et al.*, 1999), pulmão (Piythilake *et al.*, 2000), colon (Rashid *et al.*, 1997; Visca *et al.*, 1999), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003), bexiga (Visca *et al.*, 2003), sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2006) e CEC oral (Krontiras *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004; Agostini *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Apesar de FAS ser claramente necessária para a proliferação de células malignas, seu papel na regulação do ciclo celular ainda não é conhecido. Vários trabalhos têm demonstrado associação positiva entre a expressão e a atividade de FAS com progressão e com o comportamento clínico agressivo do tumor, sendo apontada como um possível fator prognóstico (Shurbaji *et al.*, 1996; Kuhajda, 2000; Piyathilake *et al.*, 2000; Myers *et al.*, 2001; Dhanasekaran *et al.*, 2001; Takahiro *et al.*, 2003; Visca *et al.*, 2003; Baron *et al.*, 2004). Neoplasias de próstata, ovário, tireóide, colo-retais e melanomas têm um comportamento biológico mais agressivo e pior prognóstico quando produzem altas quantidades desta enzima metabólica, porque sua alta expressão e atividade podem gerar vantagens seletivas para o crescimento celular (Epstein *et al.*, 1995; Gansler *et al.*, 1997; Rashid *et al.*, 1997; Vlad *et al.*, 1999; Visca *et al.*, 1999; Myers *et al.*, 2001; Innocenzi *et al.*, 2003; Baron *et al.*, 2004).

Apesar do grande número de evidências experimentais e clínicas apontando FAS como uma molécula importante na patogênese de neoplasias malignas, há relativamente poucos trabalhos na literatura sobre FAS em CECs da região de cabeça e pescoço (Krontiras *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004; Agostini *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005) e pouco se sabe sobre os mecanismos biológicos envolvidos, particularmente nos CECs bucais. Em trabalho realizado pelo nosso grupo, demonstramos que a enzima FAS é expressa em 78% de 62 casos de CEC da região de cabeça e pescoço,

principalmente nas lesões microscopicamente bem diferenciadas (Silva *et al.*, 2004), concordando com os achados de Krontiras *et al.* (1999). Por outro lado, a expressão de FAS no epitélio morfológicamente normal adjacente ficou restrita às camadas celulares inferiores, onde ocorrem divisões celulares, enquanto que nas displasias epiteliais moderadas ou severas, FAS passou a ser detectada na maioria das células da camada espinhosa (Silva *et al.*, 2004). Agostini *et al.* (2004) demonstraram, através de experimentos com cultura de linhagens celulares derivadas de CECs bucais, que estas produzem grandes quantidades de FAS e que o bloqueio da sua atividade inibe significativamente a proliferação. Porém, nenhum dos trabalhos que estudaram expressão de FAS em CECs bucais constataram correlação com fatores prognósticos.

A atividade de FAS está de alguma maneira ligada à progressão do ciclo celular das células tumorais. Uma síntese adicional de ácidos graxos parece ser requerida para síntese das membranas celulares de células tumorais em rápida divisão mitótica, pois os ácidos graxos de cadeias longas produzidos a partir de estereato e palmitato (gerados pela FAS) são necessários para a divisão celular (Hannun & Obeid, 2002). Além do mais, o aumento, tanto da expressão como da atividade enzimática de FAS, é necessário para a produção de fosfolipídios de membrana em linhagem celular derivada de câncer de próstata (LNCaP) (Swinnen *et al.*, 2003). De acordo com Baron *et al.* (2004), alterações na composição lipídica das membranas celulares, como resultado da expressão elevada de FAS, podem ter efeitos profundos em várias vias de transdução de sinais.

2.4.2. Regulação da expressão de FAS

Apesar das evidências sugerindo que a síntese endógena de ácidos graxos seja um processo essencial para a sobrevivência e proliferação das células neoplásicas não se conhece, até o presente momento, qual o mecanismo biológico envolvido. A produção anormal de FAS pode ser o reflexo de um descontrole do ciclo celular, ou seja, uma alta atividade proliferativa aumentaria as

necessidades de ácidos graxos para a síntese das membranas das células em divisão, entretanto, o mecanismo que conecta estes dois sistemas (ciclo celular e síntese de ácidos graxos) ainda não está elucidado. A expressão de FAS é estimulada através do aumento da quantidade de seus RNAs mensageiros, em conjunto com várias outras enzimas da mesma via metabólica (Milgraum *et al.*, 1997; Swinnen *et al.*, 2000). Alguns trabalhos demonstram que isto pode ocorrer na presença de estrógeno, progesterona e andrógenos, nas células que respondem a estes hormônios (Swinnen *et al.*, 1997; Milgraum *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998a; Swinnen *et al.*, 2000; Lacasa *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2001; Heemers *et al.*, 2001; Van de Sande *et al.*, 2002; Heemers *et al.*, 2003). Em linhagem celular de câncer de próstata (LNCaP), a regulação da expressão de FAS é estimulada por andrógenos e pelo fator de crescimento epidérmico (EGF), através da via das proteínas de ligação a elementos regulatórios de esteróides (“*Steroid Regulatory Element Binding Protein*” - SREBPs) (Figura 5) (Swinnen *et al.*, 1997; Swinnen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2005b). Na linhagem celular MCF7, derivada de câncer de mama, a produção de FAS é estimulada por progesterona (Lacasa *et al.*, 2001).

A transcrição de genes que codificam enzimas lipogênicas, como aquelas envolvidas na manutenção da homeostase do colesterol e do controle da síntese e diferenciação dos ácidos graxos, é ativada pelas SREBPs. As SREBPs formam uma família de fatores de transcrição que estimulam a transcrição de genes que contém regiões regulatórias aos elementos de esteróides (“*Steroid Regulatory Element*” - SREs) e múltiplos genes lipogênicos (Brown & Goldstein, 1997; Swinnen *et al.*, 1997; Brown & Goldstein, 1999; Swinnen *et al.*, 2000; Heemers *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003). FASN, o gene que codifica a proteína FAS, apresenta no seu promotor duas regiões SREs independentes, que permitem o controle de sua expressão pelas proteínas SREBPs (Hsu *et al.*, 1996).

Conforme mencionado no item 2.3.2, a análise de um transcriptoma revelou conexão molecular entre a proteína ErbB2 e a enzima lipogênica FAS (Kumar-Sinha *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004). Menendez *et al.* (2004a)

demonstraram que a super-expressão de ErbB2 em fibroblastos de camundongo estimula a expressão da proteína FAS através das vias PI3K e MAPK (Figura 5) (Menendez *et al.*, 2004a; Menendez *et al.*, 2004b, Menendez *et al.*, 2005b). Da mesma maneira, ErbB2 estimula o promotor de FAS através da via PI3K em células epiteliais de mama, provocando aumento da síntese de ácidos graxos (Figura 5) (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). A ativação da via PI3K foi capaz de aumentar também a transcrição do gene que codifica FAS devido ativação de SREBP por andrógenos ou EGF em células LNCaP (Swinnen *et al.*, 1997; Swinnen *et al.*, 2000; Signoretti *et al.*, 2000; Heemers *et al.*, 2001; Van de Sande *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2004).

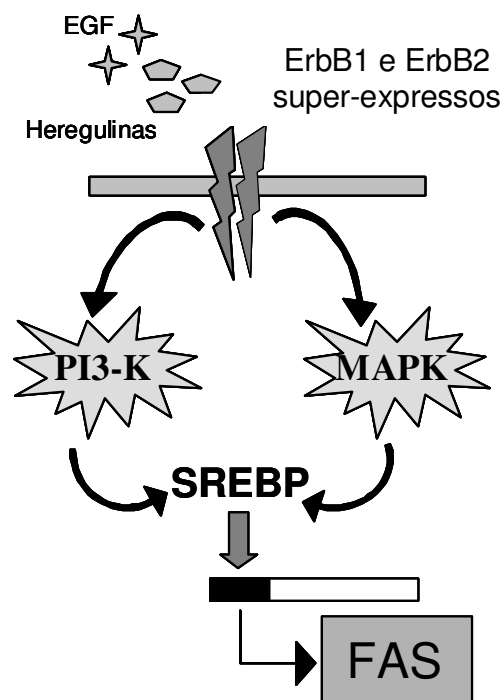


Figura 5: Representação simplificada das vias envolvidas na super-expressão de FAS. O receptor ErbB2, quando expresso em grandes quantidades em células tumorais, estimula a transcrição do gene que codifica FAS mediado pelas vias PI3K e MAPK, as quais são capazes de elevar os níveis de SREBPs.

Fonte: Modificado de Menendez *et al.* (2005b).

No entanto, nem sempre a quantidade de RNAs mensageiros de FAS corresponde a quantidade da proteína FAS, o que sugere um mecanismo de regulação pós-traducional (Rossi *et al.*, 2003). De fato, foi demonstrado que a quantidade da proteína FAS pode ser regulada em células LNCaP pelo sistema ubiquitina-proteassomo, através do controle da ligação covalente de moléculas de ubiquitina a FAS (Graner *et al.*, 2004). Estes resultados mostram que o controle da quantidade de FAS é complexo e mais estudos são ainda necessários para o entendimento da participação desta enzima tanto em processos fisiológicos como patológicos.

2.4.3. FAS como alvo terapêutico

As diferenças na expressão de FAS verificadas entre as células normais e as neoplásicas fazem desta molécula um alvo terapêutico em potencial para vários tipos de câncer (Kuhajda *et al.*, 1994; Kuhajda, 2000; Kuhajda *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2000; Gabrielson *et al.*, 2001; Thupari *et al.*, 2001; Kumar-Sinha *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2004a). De fato, diversos estudos mostram que inibidores específicos da atividade de FAS (cerulenina, C75, EGCG e Orlistat) são capazes de inibir a proliferação celular, através do bloqueio da síntese de DNA e conseqüentemente da fase S do ciclo celular, o que leva as células à morte por apoptose. A inibição de FAS também foi capaz de diminuir a atividade proliferativa e o tamanho de tumores de próstata e ovário em modelos xenográficos (Pizer *et al.*, 1996b; Kuhajda *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 2000).

A cerulenina é um produto natural do fungo “*Cephalosporium cerulens*”, capaz de inibir a atividade de FAS através de sua ligação covalente ao sítio ativo da β -cetoacil sintase, responsável pela condensação de acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda, 2000). A cerulenina tem ação inibitória sobre o crescimento de várias linhagens celulares neoplásicas (Pizer *et al.*, 1996a; 1996b; 1998b; Guo *et al.*, 2003), porém é instável. O C75 é um composto sintético mais estável e com efeitos inibitórios comparáveis aos da cerulenina (Kuhajda *et al.*, 2000). Existe ainda uma terceira substância capaz de inibir FAS, a epigallocatequina-3 galato

(EGCG), um dos principais componentes polifenólicos dos chás verdes (Brusselmans *et al.*, 2003). Esta substância é capaz de inibir FAS em células de carcinoma de próstata (LNCaP), através de ligação covalente ao sítio da β -cetoacil redutase (Wang *et al.*, 2003), resultando em inibição da proliferação celular e apoptose. Foi demonstrado também que a droga Orlistat (comercializada pela Roche com o nome *Xenical*TM), utilizada no tratamento da obesidade, é um inibidor da atividade de FAS nas células tumorais de mama e próstata devido sua capacidade de bloquear a função do domínio tioesterase desta enzima, induzindo efeitos apoptóticos e anti-proliferativos (Kridel *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005c; 2005d).

No entanto, o mecanismo exato pelo qual a inibição de FAS causa apoptose ainda não está claro, embora tenha sido proposto que o acúmulo de malonil-CoA após o tratamento com cerulenina ou C75 possa mediar, ao menos em parte, a citotoxicidade resultante da inibição da FAS (Pizer *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Thupari *et al.*, 2001; De Schrijver *et al.*, 2003). A citotoxicidade como resultado da inibição da atividade de FAS pode também ser atribuída a ativação direta de sinais apoptóticos, pois, segundo Heiligttag *et al.* (2002), o bloqueio de FAS resulta na liberação de citocromo C e ativação da via das caspases.

Apesar da inibição da atividade de FAS resultar na morte de células tumorais e diminuição do tamanho de tumores em modelos animais (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1996a; 1996b), sua aplicação *in vivo* talvez possa resultar em efeitos indesejáveis, como anorexia e perda de peso (Clegg *et al.*, 2002), além de apresentar alto potencial teratogênico (Chirala *et al.*, 2003). Almeida *et al.* (2005) demonstraram que cerulenina também bloqueia a proliferação de fibroblastos normais e de fibroblastos derivados de fibromatose gengival hereditária, em culturas primárias. Isto é especialmente importante e deve ser considerado para o desenvolvimento de terapias anti-neoplásicas baseadas na inibição de FAS.

2.5. O sistema ubiquitina (Ub)-proteassomo

O sistema ubiquitina (Ub)-proteassomo é responsável pela degradação intracelular seletiva de proteínas citoplasmáticas e nucleares que são reconhecidas pelo complexo multicatalítico do proteassomo 26S, que é dependente de Ub e ATP. Os substratos protéicos marcados para degradação são reconhecidos através da adição covalente de múltiplos monômeros de Ub (Spataro *et al.*, 1998). A maioria destas proteínas intracelulares processadas e degradadas por este mecanismo são fatores de transcrição, reguladores do ciclo celular, transdutores de sinais, apresentadores de antígenos e proteínas danificadas (Hershko & Ciechanover, 1998; Pickart, 2001).

A ubiquitina é uma proteína de 76 aminoácidos altamente conservada, encontrada somente em organismos eucarióticos e que pode existir na forma livre ou como parte de um complexo com outras proteínas. Ela participa de diversas vias importantes, incluindo o reparo de DNA, a internalização de receptores e a transdução de sinais (Wilkinson, 2000; Gousseva & Baker, 2003). O balanço entre a degradação de uma proteína e sua síntese determina a disponibilidade desta dentro da célula, e a Ub tem função de regular o *turnover* das proteínas ao servir como “etiqueta” que identifica de forma específica às proteínas-alvo marcadas para a degradação (Burger & Seth, 2004).

Esta via de degradação envolve múltiplas etapas de reações em cascatas, nas quais as enzimas E1, E2 e E3 são requeridas (Figura 6). Inicialmente, a enzima ativadora de Ub (E1) ativa o monômero de Ub e seu sitio ativo, num processo dependente de ATP, através da ligação dos resíduos de glicina na porção C-terminal à cisteína da E1. Desta forma, ocorre uma modificação estrutural da Ub para que ela possa tornar-se reativa com as cadeias laterais de lisina no substrato protéico. Então, a enzima E2, conhecida como enzima conjugadora de Ub (ou UBC), transfere a Ub de E1 para o substrato protéico a ser degradado que está ligado a ligase de Ub (E3) (Figura 6). A primeira molécula de Ub é ligada ao substrato através de ligações isopeptídicas entre a glicina C-terminal da Ub e o grupo NH₂ da cadeia lateral do resíduo de lisina do substrato.

A cadeia de poliubiquitina é formada em múltiplos ciclos desta reação por adição seqüencial de outras moléculas de Ub (Shaeffer & Cohen, 1996; Spataro *et al.*, 1998).

Proteínas poliubiquitinadas são substratos para o proteassomo 26S (Figura 6), que é formado por três subunidades de 700 kDa que atuam como um complexo multicatalítico que degrada seletivamente proteínas ligadas a moléculas de Ub. Esta estrutura consiste de uma partícula cilíndrica central denominada de 20S, composta por quatro anéis com sete subunidades onde se encontram os sítios catalíticos. Na extremidade final de cada porção 20S encontram-se duas estruturas externas denominadas de *cap* 19S ou PA700 (*proteasome activator of 700 kDa*), que contêm ATPases e estão envolvidas no processo de reconhecimento e manutenção da conformação da proteína, além de translocá-la para o interior do proteassomo 20S (Figura 6) (Rubin & Finley, 1995; Spataro *et al.*, 1998; Orłowski & Wilk, 2003). A composição e a função do complexo regulatório deste sistema não estão totalmente esclarecidas, porém dados recentes mostram que a ubiquitinação é um processo reversível e a retirada de moléculas de Ub desempenha um importante papel na regulação da função proteassômica (Wilkinson, 1997; Chung & Baek, 1999).

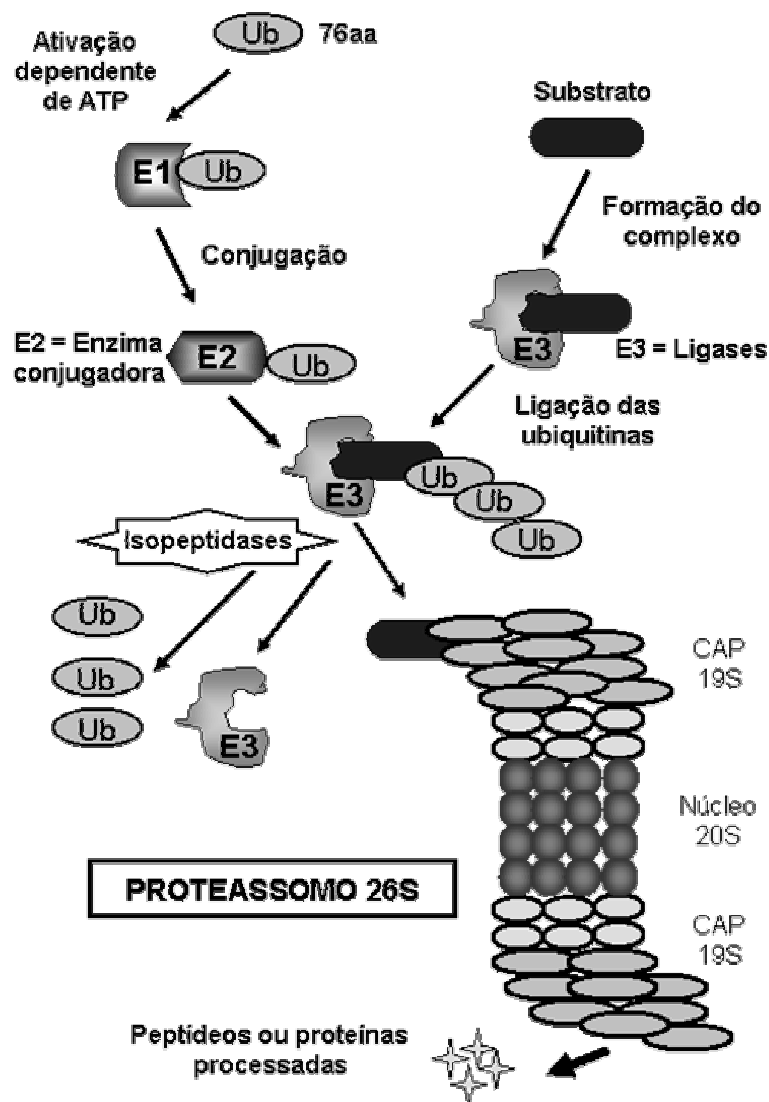


Figura 6: Representação esquemática do mecanismo de degradação proteica através da via de ubiquitina-proteassomo. Este sistema consiste da enzima ativadora de Ub (E1), da enzima conjugadora (E2) e da ligase de Ub (E3), que reconhece o substrato a ser degradado. As proteínas marcadas são alvos para degradação no proteassomo 26S. Proteínas mono ou poliubiquitinadas podem sofrer ação de isopeptidases, ou DUBs, capazes de remover moléculas de Ub. O proteassomo quebra seu substrato em pequenos peptídeos. O complexo multicatalítico é formado por um núcleo 20S e dois caps 19S (PA700) nas extremidades.

Fonte: Modificado das imagens do *Massachusetts Institute of Technology*.

2.6. As enzimas desubiquitinantes (DUBs) ou isopeptidases

As enzimas desubiquitinantes (deubiquitinating enzymes ou DUBs) regulam negativamente a proteólise da via Ub-proteassomo e estão agrupadas de acordo com sua seqüência homóloga em duas grandes classes: as UCHs (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases) e as UBPs (ubiquitin processing proteases), também denominadas em humanos de USPs (ubiquitin specific proteases). Embora haja separação em classes distintas, a função desempenhada por cada classe é equivalente, ambas catalisam a remoção de moléculas de Ub conjugadas a proteínas através de ligações isopeptídicas, sendo por isto, conhecidas também como isopeptidases (Figura 6) (Wing, 2003). As USPs são cisteína proteases com seqüências altamente conservadas, que compõe uma família de aproximadamente 50 membros já caracterizados em humanos. Apesar do grande número destas enzimas, pouco se conhece sobre o papel fisiológico ou seus substratos específicos (Priolo *et al.*, 2006).

As DUBs podem atuar dentro do proteassomo, editando o número de moléculas de Ub das cadeias de poli-Ub, protegendo as proteínas-alvo insuficientemente ou erroneamente marcadas para destruição (Schaeffer & Cohen, 1996; Lam *et al.*, 1997). Há evidências de que as DUBs também funcionem de maneira pré-proteassômica, para proteger ou prevenir seus substratos da degradação e assim controlar a disponibilidade destes para a célula (DeSalle *et al.*, 2001). Kim *et al.* (2003), em um extenso trabalho de revisão, descreveram as enzimas desubiquitinantes como reguladores celulares, participando de vários processos biológicos importantes, como o crescimento e diferenciação celular, desenvolvimento, oncogênese, doenças neurológicas, resposta ao *stress*, reparo do DNA, internalização de receptores, apoptose e regulação transcricional.

As DUBs agem de forma específica em substratos definidos. A enzima desubiquitinante HAUSP (USP7) é reguladora de p53 e Mdm2 (Cummins & Vogelstein, 2004; Li *et al.*, 2004). O produto protéico do gene supressor de tumor da cilindromatose familiar (CYLD) modula a atividade do fator nuclear κ B através

de um mecanismo similar (Kovalenko *et al.*, 2003). Finalmente, a USP2a está associada com a remoção de Ub da enzima FAS, o que prolongaria sua meia vida (Graner *et al.*, 2004). Estes mecanismos são fundamentais, uma vez que alterações no processo de ubiquitinação/desubiquitinação podem estar diretamente implicadas na tumorigênese. Ciechanover & Schwartz (2004) afirmam que os tumores malignos podem ser o resultado da estabilização de oncoproteínas e fatores que promovam o crescimento, ou ainda, da desestabilização de proteínas supressoras de tumor.

2.6.1. A isopeptidase (ou enzima desubiquitinante) USP2a

No ano de 2004, duas novas DUBs foram identificadas em próstata de ratos e denominadas de UBP-69 e UBP-45, cuja expressão ocorre também em outros tecidos, como cérebro, baço, testículo, fígado e rins (Gousseva & Baker, 2003; Graner *et al.*, 2004). Graner *et al.* (2004), utilizando a linhagem celular derivada de câncer de próstata LNCaP, encontraram os genes homólogos humanos localizados no cromossomo 11q23.3, os quais foram chamados de USP2a (homólogo de UBP-69, Genbank # NM004205) e USP2b (homólogo de UBP-45, Genbank # AF440755). Estas duas variantes são formadas a partir de *splicing* alternativo, a partir de um gene formado por 16 éxons contendo 29125 pb (Gousseva & Baker, 2003).

Graner *et al.* (2004) demonstraram que a enzima ácido graxo sintase (FAS) é um substrato específico de USP2a e que a expressão de USP2a é controlada por andrógenos na próstata, sendo este o primeiro relato de uma DUB cuja expressão está sob controle hormonal (Graner *et al.*, 2004). Em carcinomas de próstata, ocorre alta expressão de USP2a e de FAS, sendo que ambas co-localizam e interagem (Graner *et al.*, 2004). A transfecção em linhagem celular LNCaP com USP2a previne a degradação de FAS dependente de ubiquitina, enquanto que a indução de super-expressão da forma mutante USP2a-Cys276Ala aumenta a degradação de FAS. Da mesma forma, o silenciamento de USP2a, através do uso da tecnologia de RNA de interferência, desencadeia o

acúmulo de formas ubiquitinadas de FAS e uma significativa queda dos níveis protéicos, enquanto que os níveis dos RNAs mensageiros permanecem inalterados, confirmando que a quantidade de FAS é dependente da expressão de USP2a (Graner *et al.*, 2004). No mesmo trabalho, os autores demonstraram que o uso de oligonucleotídeos antisense para USP2a ou o uso de inibidores específicos da atividade de FAS induzem apoptose nas células do câncer de próstata.

Priolo *et al.* (2006) demonstraram que USP2a está super-expressa em carcinomas de próstata, em comparação com o tecido morfológicamente normal das áreas adjacentes. Através do uso de *microarray* de cDNA, os autores encontraram associação positiva entre os tumores que super-expressaram USP2a com um grupo de genes envolvidos na síntese e metabolismo dos ácidos graxos, dentre eles a enzima FAS. Interessantemente, os receptores da família tirosina-quinase ErbB e a proteína supressora de tumor p-53 estavam super-expressos nos tumores que apresentaram altos níveis desta DUB. Os autores demonstraram também que o silenciamento de USP2a causa significativo aumento das taxas de apoptose na linhagem celular LNCaP. Devido ao papel desempenhado por USP2a na sobrevivência de células tumorais de câncer de próstata, através da estabilização da proteína FAS, os dados da literatura sugerem que esta isopetidase pode representar um potencial alvo terapêutico para neoplasias humanas.

3. PROPOSIÇÃO

O propósito deste trabalho foi:

1. Quantificar, através de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR), a expressão de USP2a, FAS, ErbB2 e RA em amostras de CECs de boca microdissecadas a *laser*.
2. Analisar, através de reações imunohistoquímicas, a expressão das proteínas FAS, ErbB2, Ki-67 e RA, nestes tumores.
3. Correlacionar os resultados dos objetivos 1 e 2 com os dados clínicos e patológicos daqueles tumores, como tempo de sobrevida, presença de metástases regionais ou à distância e recidiva das lesões.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostras estudadas

Foram selecionados quarenta e um casos de CEC de boca com tecido morfológicamente normal nas margens cirúrgicas da lesão, diagnosticados e tratados no período de 1985 a 2003, no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo, São Paulo. Todas as amostras foram provenientes de fragmentos de peças cirúrgicas armazenadas em um tanque de nitrogênio líquido ou congeladas em temperaturas iguais ou menores que 80 graus negativos, no Banco de Tumores do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Os blocos de parafina correspondentes às peças cirúrgicas congeladas foram separados para a realização das reações imunohistoquímicas.

As informações clínicas referentes a estes pacientes, como idade, gênero, localização das lesões primárias, estadiamento clínico do tumor segundo a União Internacional Contra o Câncer (TNM), presença de recorrências ou metástases e situação da última avaliação, foram criteriosamente coletadas dos prontuários clínicos, através de um formulário padronizado (Anexo 1). Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (#145/2004) e do Hospital A.C. Camargo (#618/04) (Anexos 2 e 3). A coleta das amostras utilizadas possuem consentimento livre e esclarecido do paciente devidamente assinado.

4.2. Análise histopatológica

Os blocos de parafina de cada tumor foram cortados na espessura de 5 µm para análise histopatológica. Da mesma forma, foram realizados cortes de 5 µm de espessura nas amostras congeladas e incluídas em *tissue tek* com auxílio de um criostato (a -30°C) sendo todas as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Para determinar a diferenciação celular de cada tumor, o critério de Anneroth *et al.* (1987) foi utilizado.

4.3. Reações imunohistoquímicas (IHQ)

Para a realização das reações imunohistoquímicas, os blocos de parafina de cada tumor foram cortados na espessura de 3 μ m e os fragmentos colocados sobre lâminas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma, EUA). Os cortes foram desparafinizados através de duas trocas de xilol, sendo a primeira de 10 minutos em estufa a 56°C e a segunda a temperatura ambiente, por 10 minutos. A seguir os cortes foram hidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70% e 50%) e posteriormente lavados em água corrente. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ (10 volumes) a 3% em cinco incubações de cinco minutos cada, após as quais os cortes foram lavados em água corrente. A recuperação antigênica foi feita através da imersão das lâminas em um recipiente contendo uma solução de ácido cítrico a 10 mM (pH 6,0) e incubação em forno de microondas (Panasonic modelo NN7809BH, 1380W) em potência máxima, durante dois ciclos de 12 minutos cada. As lâminas foram resfriadas em água corrente e colocadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 10 mM (pH 7,0). Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma, EUA) e azida sódica (NaN₃) a 0,1%: anti-FAS (Transduction Laboratories, EUA, 1:3.000), anti-RA (Upstate Biotechnology, PG-21, EUA, 1:200), anti-ErbB2 (Dako, policlonal, Dinamarca, 1:200) e anti-Ki-67 (Dako, Dinamarca, MIB-1, 1:200). Os cortes foram incubados com os anticorpos primários em câmara úmida, por um período de 16 horas a 4°C. A seguir, foram lavados com três trocas de PBS e incubados com os anticorpos secundários biotinilados (Strept ABC – Complex/HRP Duet Kit, Dako, EUA, 1:500), específicos para a espécie animal em que foi produzido o anticorpo primário, durante trinta minutos a 37°C. Em seguida, os cortes foram lavados com três trocas de PBS e incubados com complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Strept ABC – Complex/HRP Duet Kit, Dako, 1:500) por mais trinta minutos a 37°C. Antes da revelação com o substrato cromogênico, as lâminas foram lavadas novamente com PBS e as reações evidenciadas com solução de

tetracloreto de 3,3' diaminobenzidina (DAB) a 0,06% (Sigma, EUA) em PBS contendo H₂O₂ e dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, EUA) por cinco minutos a 37 °C em câmara escura. A seguir, os cortes foram lavados em água corrente e contra-corados com hematoxilina de Carazzi por 3 minutos. Seguindo-se nova lavagem com água corrente para eliminar os excessos do corante, os cortes foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol (50%, 80%, 95% e 100%), diafanizados em xilol e finalmente montados com Bálsamo do Canadá. As reações sempre foram acompanhadas de controle positivo, em tecidos sabidamente positivos para o anticorpo testado e dois controles negativos. O primeiro deles foi realizado pela omissão do anticorpo primário e o segundo através da retirada do anticorpo secundário durante a reação.

Após a realização das reações imunohistoquímicas, os resultados foram analisados em microscópio óptico e classificados em relação a intensidade da reação, número de células positivas e padrão de marcação, dependendo do anticorpo analisado. O padrão da marcação citoplasmático e/ou em membrana plasmática, como a positividade e a intensidade para FAS e ErbB2 foram avaliadas por dois observadores de maneira independente. Em relação à positividade de marcação, as reações foram consideradas positivas se a coloração foi específica no tecido de interesse com frequência maior que 10% na lâmina analisada. Quando positivas, as lâminas foram classificadas de acordo com a intensidade e agrupadas nas categorias de reações com intensidade fraca ou forte, considerando a marcação com frequência maior que 50% no corte avaliado. A intensidade foi classificada forte quando a marcação foi facilmente observada em objetiva de menor aumento no microscópio óptico comum.

A quantificação das células com positividade nuclear para Ki-67 foi feita utilizando-se o sistema de análise computadorizada de imagens KS 400 (Karl Zeiss, KONTRON-Eletronik, Alemanha). O índice de positividade foi obtido através da leitura 1000 células (aumento de 400x) em cada lâmina, sendo que a escolha da região foi determinada pela integridade estrutural do tecido e

positividade mais evidente (quando houve). As células positivas e negativas foram contadas e os resultados expressos em porcentagem de células por campo.

4.4. Microdissecção a *laser*

O aparelho utilizado para microdissecar as amostras congeladas foi o *PixCell® II Laser Capture Microdissection (LCM) System* (Arcturus, EUA). Este sistema consiste de um microscópio invertido ao qual é acoplada uma fonte de raio *laser* infravermelho de baixa potência e uma câmera ligada a um monitor e a um computador. A lâmina com o corte histológico corada com azul de toluidina é fixada ao *chariot* por um mecanismo de sucção a vácuo. O feixe de raio *laser* incide sobre um *cap* revestido por um filme termoplástico. Este *cap* fica posicionado entre o *laser* e o corte histológico. Com o acionamento do *laser* o filme termoplástico se funde e adere às células escolhidas. Quando o pulso cessa, o filme retrai levando consigo a célula de interesse aderida à sua superfície. Desta forma, repete-se a operação quantas vezes forem necessárias. No final, retira-se o *cap* com as células aderidas e iniciam-se os procedimentos de extração do RNA (Figura 7).

4.5. Extração de RNA total

O RNA total das amostras microdissecadas a *laser*, foi extraído utilizando o *kit PicoPure RNA Isolation Kit®* (Arcturus, EUA), seguindo as recomendações do fabricante (Anexo 4).

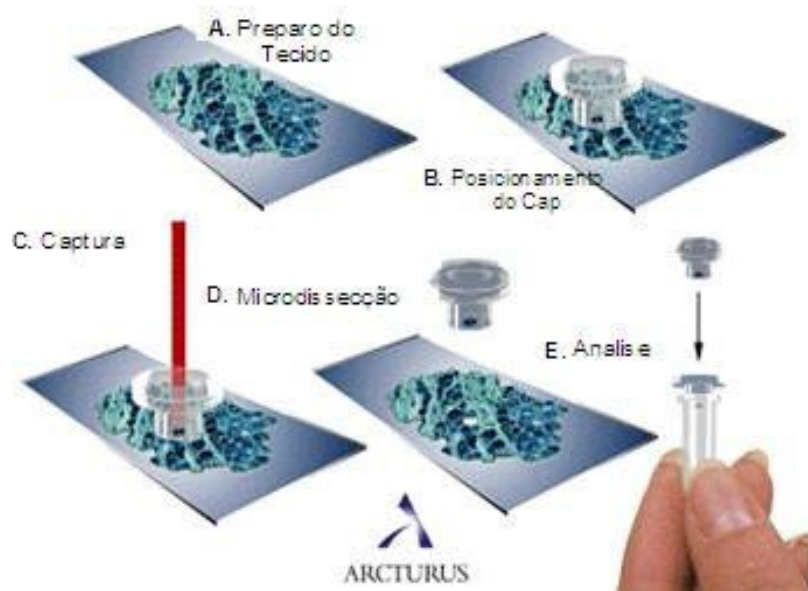


Figura 7. A microdissecção é realizada em cortes de tecido congelado a uma temperatura de -80°C corados com azul de toluidina (A). O *cap* é colocado em contato com o tecido e posicionado na região de interesse (B), estes *caps* possuem uma película protetora que absorve a radiação *laser*, com finalidade de preservar a integridade do material capturado (C). Com o pulso do *laser*, esta película do *cap* se expande de modo que a célula de interesse fique aderida a ele (D). As células selecionadas por microdissecção são removidas através de um tampão recomendado pelo fabricante (E).

Fonte: Arcturus LCM Systems & Reagents. Figura retirada do site www.arctur.com

4.6. Amplificação do RNA

O protocolo utilizado foi baseado no método descrito por Gomes *et al.* (2003), que permite amplificar a quantidade de RNA mensageiro de 3×10^2 a 3×10^3 vezes. Através deste método, o cDNA é sintetizado a partir do RNA total, utilizando-se *primers* que ancoram na cauda de poli-A dos RNAs mensageiros e possuem sítio para a RNA polimerase II. Para uma produção exponencial de RNA, este cDNA foi submetido à transcrição *in vitro* em um ciclo de amplificação. Entretanto, nas amostras provenientes de LCM foram necessárias algumas alterações no protocolo original, como o tempo de pareamento e alteração do *primer* para síntese de primeira fita e adição de carreadores, como o glicogênio e acrilamida, as quais foram estabelecidas por Saraiva *et al.* (2006). O procedimento detalhado está no Anexo 5.

4.7. Avaliação da qualidade e da quantidade das amostras de RNA provenientes de LCM

Devido a pouca quantidade de RNA isolado das amostras microdissecadas, a qualidade deste material foi avaliada por uma reação de RT-PCR convencional utilizando *primers* para o transcrito NOTCH2, que amplificam um segmento localizado entre os nucleotídeos 5107 e 5320 da região 5' do gene que possui 11433 pb (*Foward*- 5' GGTGAACAAGAACAGGAG 3'; *Reverse*- 5' GATGACAACAGCAACAGC 3'). O aparecimento do fragmento amplificado de 231 pb, localizado a 6336 pb da região 3' do gene, demonstra eficiência da transcrição e integridade do RNA mensageiro. Após a síntese da primeira fita de cDNA, no processo de amplificação, foram separados 2 µl da reação, que foram diluídos em 8 µl de água tratada com DEPC. Desta diluição, 2 µl foram utilizados como molde numa reação de PCR contendo 1 mM de MgCl₂, 0,2 µM de dNTPs (Invitrogen), 0,7 µM de cada *primer*, 1X tampão de reação 10X, 1U de *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) num volume final de 25 µl. O programa de PCR consistiu em 2 minutos iniciais de desnaturação a temperatura de 94°C, 40 ciclos repetidos com 1 minuto a 94°C, 1 minuto com a temperatura de 56°C e 1 minuto a 72°C, por fim, um ciclo único de 7 minutos a 72°C. Os produtos foram visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, com posterior impregnação pela prata (Sanguinetti *et al.*, 1994).

A quantificação do cDNA das amostras de RNA amplificadas foi feita pela leitura em espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000), com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando-se que 1 OD a 260 nm equivale a 50 ng/µl de cDNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do DNA por fenol ou proteínas.

4.8. Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)

4.8.1. RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)

qRT-PCR ou RT-PCR em tempo real avalia o acúmulo do produto na fase logarítmica da reação de amplificação e está diretamente relacionado à quantidade de transcritos existentes no início da reação, sendo considerado um método preciso e reprodutível para mensurar a expressão gênica. A observação contínua da fluorescência emitida pelo DNA amplificado permite uma quantificação rápida e exata do número de cópias de um transcrito específico presente em uma dada amostra de RNA (Morrison *et al.*, 1998).

O sistema de detecção utilizado neste trabalho foi o *SYBR® Green*, que se baseia na utilização de uma molécula fluorescente denominada *SYBR® Green I* que, quando intercalada à dupla fita de DNA, passa a emitir fluorescência. Durante os ciclos iniciais da reação de PCR o sinal de fluorescência emitido pelo *SYBR® Green I* é fraco para ser detectado (não ultrapassando o sinal de fluorescência de fundo). Entretanto, no decorrer dos ciclos da reação de PCR, há um aumento do produto amplificado e conseqüentemente do sinal fluorescente, que passa então a ser detectável. Desta forma, os valores obtidos provêm do ponto em que a amplificação do produto foi detectada, diferente da reação de PCR convencional, na qual a detecção acontece depois de um número fixo de ciclos, o que representa a quantidade final de cada produto acumulado. Nesta metodologia, a quantificação da expressão gênica é baseada no parâmetro de *CTs* (*Threshold Cycle* ou ciclo limite) ou *CPs* (*Crossing Point* ou ponto de cruzamento), definido como o número do ciclo em que a fluorescência gerada atinge um limite acima da fluorescência de fundo (Livak *et al.*, 2001), sendo os dados de quantificação analisados pelo programa de análise do aparelho (Morrison *et al.*, 1998).

4.8.2. Padronização das concentrações de cDNA e de *primers*

Todos os experimentos foram realizados no mesmo aparelho *ABI Prism™ 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) em um volume final de 20 µl. Para cada gene estudado foi realizada uma cinética de amplificação numa reação de qRT-PCR usando diferentes concentrações de *primers* e diferentes diluições de uma mesma amostra e as quantidades ideais foram padronizadas individualmente. As concentrações dos *primers* foram padronizadas considerando a utilização das menores concentrações possíveis, a fim de evitar a formação de dímeros, e a obtenção dos menores valores de CTs.

Obtidas as condições ideais, cada reação foi realizada em triplicata na presença de 10 µl de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 200 nM, 400 nM ou 800 nM de cada *primer* (Tabela 1) e 2 ng de cada amostra de cDNA. As reações, incluindo suas triplicatas, foram realizadas em placas de 96 wells - *MicroAmp® Optical* (Applied Biosystems). As condições de amplificação consistiram em 2 minutos a 50°C para a ativação da enzima *AmpErase*, 10 minutos a 95°C para a ativação da enzima *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos e um minuto a 60°C para o pareamento dos *primers* e extensão. Ao final da amplificação foi adicionada uma etapa de 20 minutos de duração, na qual a temperatura aumentou gradualmente de 60°C para 95°C a 0,2°C por segundo com a contínua aquisição da fluorescência (Morrisson *et al.*, 1998). Esta última etapa tem por objetivo submeter os produtos amplificados à análise da curva de dissociação, utilizada para confirmação da especificidade da amplificação. A especificidade de cada fragmento foi também analisada em gel de poliacrilamida a 8%.

4.8.3. Cálculo da eficiência de amplificação (E)

Para determinar a eficiência de amplificação dos *primers* específicos para os transcritos de interesse (transcritos alvo) ou normalizadores, foi construída uma curva padrão utilizando 5 diferentes concentrações de cDNA em triplicata (10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng e 0,001 ng) obtidas por meio de diluição seriada de

cDNA da linhagem celular SCC-9 (CRL-1629), proveniente de CEC bucal humano adquirida da “*American Type Culture Collection*” (ATCC, EUA).

O cálculo da eficiência de amplificação foi feito para cada gene através da fórmula $[E = 10^{(-1/slope)}]$ recomendada pelo manual da *Applied Biosystems*, em que *slope* corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a relação entre o logaritmo da concentração das amostras pelo CT de cada ponto da curva padrão.

4.8.4. Seleção dos genes referência ou normalizadores

Foram desenhados *primers* para 4 genes considerados pela literatura como sendo de expressão constitutiva ou *housekeeping*: GAPDH (NM_002046.2), ACTB (NM_001101.2), HPRT1 (NM_000194) e BCRP (NM_004327) (Vandesompele *et al.*, 2002; Kok *et al.*, 2004; Huggett *et al.*, 2005) (Tabela 1). Os níveis de expressão destes genes foram determinados a partir dos valores médios das triplicatas da linhagem celular SCC-9 e das amostras pareadas dos 41 casos. Os valores foram tabulados em planilha EXCEL 9.0/2000 (Microsoft, EUA).

Foi utilizada a ferramenta geNorm (Visual Basic Application - VBA) disponível *online* (<http://medgen.urgent.be/~jvdesomp/genorm/>), que calculou automaticamente quais dos genes testados foram os mais estáveis no grupo de amostras para serem utilizados como normalizadores. A estabilidade dos genes normalizadores é determinada partindo-se do princípio de que dois genes normalizadores ideais possuem razões de expressão idênticas em todas as amostras de cDNA analisadas, independente das condições experimentais ou de tipos celulares. A razão de expressão de cada gene normalizador em relação aos demais é analisada sempre aos pares, o que permite a exclusão dos genes menos estáveis. A cada gene normalizador excluído o programa automaticamente atribui um novo valor referente à estabilidade dos demais genes normalizadores nas amostras de cDNA. Esse processo ocorre diversas vezes até que permaneçam apenas os genes cujos níveis de expressão sejam os mais estáveis, determinando, assim, a combinação mais adequada a ser utilizada nas análises de qRT-PCR.

Tabela 1. Genes alvo e referência selecionados para verificação da expressão diferencial em amostras de carcinomas espinocelulares microdissecadas a *laser*.

Genes	*ACC	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)	Condições de PCR	
					TA (°C)	primers nM
GAPDH	NM_002046.2	GAAGGTGAAGGTCGGA	GGGTCATTGATGGCAAC	102	63	200
ACTB	NM_001101.2	GCACCCAGCACAATGAAG	CTTGCTGATCCACATCTGC	117	64	200
HPRT1	NM_000194	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT	116	60	400
BCRP	NM_004327.	CCTTCGACGTCAATAACAAGGAT	CCTGCGATGGCGTTTAC	112	60	400
FASN	NM_004104	AACTCCTTGCGGAAGAGA	TAGGACCCCGTGGAATGTCA	182	60	400
AR	NM_000044	GCTCCTGGACTCCGTGCA	GGTGAGCGTGGACTTTCCG	94	60	800
ERBB2	NM_001005862.	CCCTCTGAGACTGATGGCTACG	GCCGAACATCTGGCTGGTT	79	60	400
USP2a	NM_004205.	GCCGCTACACACTGTGGGA	AGCATCCTGCTGATTATAGC	382	60	400
USP2b	NM_004205.	AAGGAGCTGCGGCCGCGCTC	AGCATCCTGCTGATTATAGC	383	60	800

*ACC: Número de acesso da sequência do nucleotídeo ao banco UniGene do NCBI

4.8.5. Análise da expressão gênica

A expressão diferencial dos transcritos alvo foi determinada pelo método de quantificação relativa a um gene normalizador. A expressão gênica foi calculada pela equação matemática proposta por Pfaffl (2001), que analisa individualmente as eficiências de amplificação de cada gene (E).

$$\text{Expressão relativa} = (E \text{ alvo})^{\Delta CT \text{ alvo}} / (E \text{ normalizador})^{\Delta CT \text{ normalizador}}$$

Nesta equação, **E alvo** corresponde à eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o transcrito alvo, **E normalizador** corresponde à eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o gene normalizador, **ΔCT alvo** corresponde à diferença entre o CT do transcrito alvo obtido para a amostra tumoral em análise e o CT do transcrito alvo obtido para a amostra morfológicamente normal pareada, **ΔCT normalizador** corresponde à diferença entre o CT do gene normalizador obtido para a amostra em tumoral em análise e o CT do gene normalizador obtido para a amostra morfológicamente normal pareada.

4.9. Análises estatísticas

Estatísticas descritivas foram utilizadas para caracterizar a casuística. A análise de correlações entre as diversas variáveis estudadas foi realizada empregando-se o teste qui-quadrado em tabelas de contingência de dupla entrada. Análises realizadas em tabelas 2x2 (cotejamento de pares de variáveis dicotômicas) foram sempre elaboradas sem correlação de continuidade para o valor qui-quadrado obtido. Quando as frequências esperadas foram menores do que cinco ou o número da amostra foi pequeno, os resultados foram analisados por meio do teste exato de Fisher com intuito de evitar distorções de significância estatística. O nível de significância a ser adotado para todas as análises estatísticas a ser realizadas foi de 5%.

A sobrevida global, que corresponde ao tempo decorrido entre a data do início do tratamento e o óbito do paciente ou o tempo entre o início do tratamento e a última informação objetiva, foi analisado através do método de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas de sobrevida global, de acordo com as variáveis estudadas (informações clínicas, histopatológicas, imunohistoquímicas e dados de expressão gênica) foi analisada pelo teste de log-rank.

A sobrevida livre de doença, que corresponde ao tempo decorrido entre a data do início do tratamento e ocorrência de recidiva local, regional ou à distância (metástases) foi também estudada através do método de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas de sobrevida livre de doença, de acordo com as variáveis estudadas (informações clínicas, histopatológicas, imunohistoquímicas e dados de expressão gênica) foi analisada pelo teste de log-rank.

5. RESULTADOS

Foram selecionados 41 casos de CEC de boca, que foram acompanhados por um período mínimo de 3,9 e máximo de 102 meses, sendo todos os tumores primários e sem nenhum tratamento prévio.

5.1. Características clínicas e epidemiológicas da amostra estudada

Dos 41 pacientes analisados, 35 (85,37%) eram do gênero masculino e apenas 6 (14,63%) do gênero feminino (Figura 8, Tabela 2). A idade dos pacientes no momento do diagnóstico variou de 35 a 83 anos, sendo a média de 59,2 anos. O tempo de queixa ou período médio entre o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas e a consulta inicial foi em média 4,8 meses, variando de 1 a 24 meses. História de consumo de bebidas alcoólicas foi observada em 29 casos (76,31%) e o hábito de fumar tabaco foi relatado por 30 pacientes (76,92%) (Figura 8, Tabela 2).

Todos os casos estudados estavam localizados na cavidade oral e por ser a língua o local mais freqüentemente acometido nesta região, foi a que compôs a maioria dos casos desta amostragem (33 casos ou 81,5%), seguido pelo assoalho bucal (4 casos ou 9,7%), palato (2 casos ou 4,4%) e região retromolar (2 casos ou 4,4%). Dos 33 pacientes portadores de tumores de língua, 13 casos (30,96%) estavam localizados na borda anterior, 18 casos (42,86%) na borda posterior, 5 casos (11,9%) na região dorsal, 3 casos (7,14%) no ventre de língua e 3 casos (7,14%) na base lingual, sendo que em 9 casos (27,3%) havia mais de uma localização acometida. Dezesete lesões (56,67%) estavam localizadas do lado direito, 9 casos (30%) do lado esquerdo, 3 casos (10%) na linha mediana e somente 1 caso (3,33%) havia acometimento bilateral. Dos tumores localizados na língua, em 20 casos (60,6%) havia extensão para outras regiões adjacentes, como assoalho bucal, gengiva, região retromolar, mandíbula e pele.

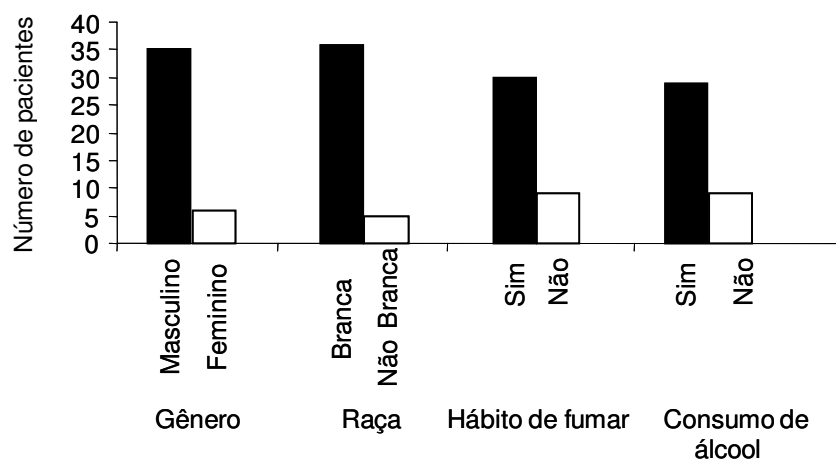


Figura 8. Distribuição da amostra estudada segundo gênero, raça, hábito de fumar e consumo de bebidas alcoólicas.

De acordo com os critérios estabelecidos pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), 5 casos (12,5%) foram classificados como sendo T1, ou seja, o tamanho do tumor primário não ultrapassou 2 cm. Em 16 casos (40%) o tumor foi classificado como T2, pois apresentava mais de 2 cm, com no máximo 4 cm. Em 4 casos (10%) o tumor era maior que 4 cm, sendo classificado como T3 e em 15 pacientes (37,5%) o tumor já invadia as estruturas adjacentes e foi classificado como T4. No momento do diagnóstico, em 20 casos (48,78%) não foram constatadas metástases nos linfonodos regionais, sendo os tumores classificados como N0 e 21 pacientes (51,22%) foram diagnosticados com metástases nestes linfonodos, sendo estes classificados como N+, independentemente do tamanho ou localização (homolaterais, bilaterais, ou contralaterais). Nenhum paciente estudado possuía metástases à distância no momento do diagnóstico (Figura 9, Tabela 2).

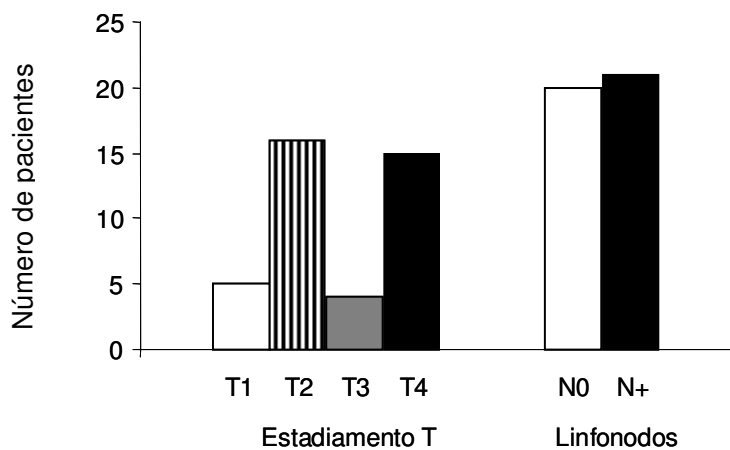


Figura 9. Distribuição dos CECs de boca segundo o estadiamento clínico do tumor, no momento do diagnóstico.

5.2. Características histopatológicas

Para analisar os casos que compuseram esta amostra foram realizados cortes histológicos de 5µm corados com hematoxilina e eosina (H&E) que revelaram presença de ilhas ou lençóis de células epiteliais malignas, com variados graus de pleomorfismo celular e nuclear. Segundo a gradação histopatológica dos CECs preconizada por Anneroth *et al.* (1987), 13 casos (31,71%) foram classificados como grau I, ou seja, o tumor estava bem diferenciado exibindo morfologia semelhante a do tecido epitelial normal. A maioria dos espécimes (25 casos ou 60,98%) foi classificada como grau II, ou moderadamente diferenciado e somente 3 casos (7,31%) foram enquadrados como grau III ou pouco diferenciados (Figura 10, Tabela 2).

Microscopicamente, 36 tumores (90%) não apresentaram invasão vascular, 29 tumores (72,5%) não invadiam vasos linfáticos, porém na maioria dos casos (22 ou 55%) foi notada presença de invasão perineural (Figura 10, Tabela 2). A espessura de invasão do tumor variou de 3 mm a 78 mm, com média de 29 mm.

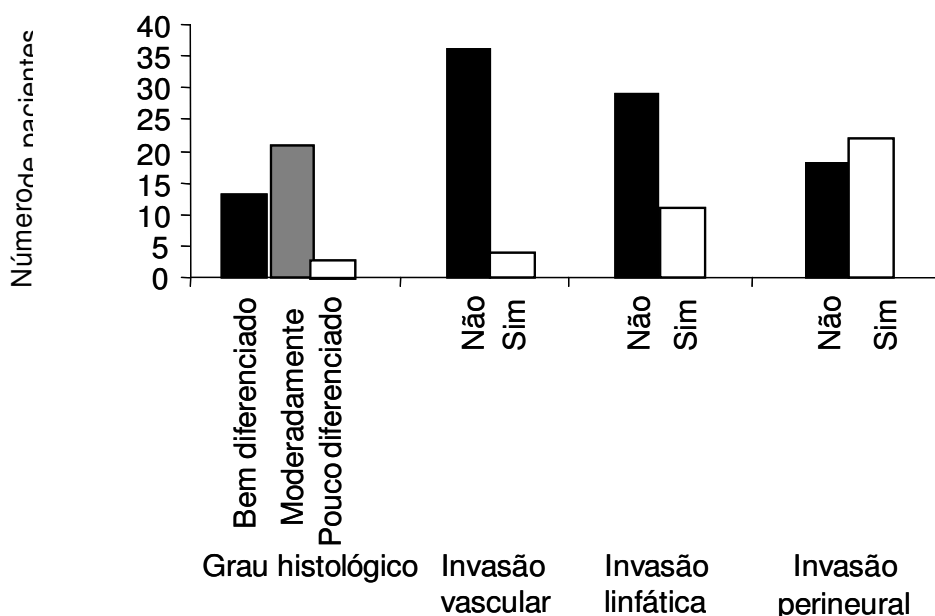


Figura 10. Distribuição dos CECs de boca segundo suas características histopatológicas.

5.3. Tipos de tratamento recebido pelos pacientes

Os pacientes incluídos neste estudo foram tratados de acordo com o protocolo vigente no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo, São Paulo. Dos casos estudados, 12 pacientes (29,3%) foram tratados somente com cirurgia, 23 casos (56,1%) com cirurgia associada à radioterapia e 6 casos (14,6%) com cirurgia associada à radioterapia e quimioterapia (Figura 5). Nenhum paciente que compôs esta amostra foi tratado somente com quimioterapia ou radioterapia. Dos pacientes que receberam radioterapia associada ao tratamento cirúrgico da lesão, a média de dose da radiação utilizada foi de 5075 cGy.

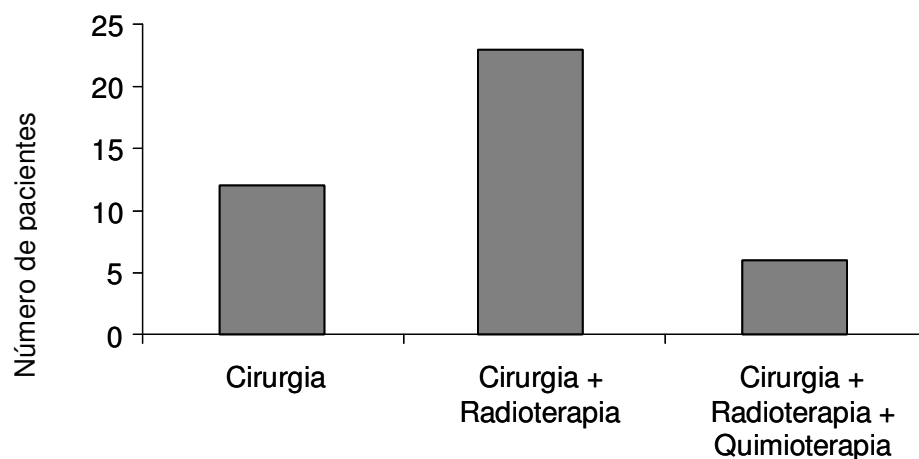


Figura 11. Distribuição dos CECs de boca segundo o tipo de tratamento realizado.

Em 37 (90,24%) dos casos selecionados houve a necessidade de se realizar esvaziamento cervical contralateral e/ou ipsilateral, com uma média de 65 linfonodos retirados no ato cirúrgico. Dos pacientes que tiveram linfonodos removidos, 26 casos (63,41%) confirmaram o comprometimento microscópico, ou seja, havia infiltração de células malignas nos linfonodos, sendo que em 16 casos (43,24%) já havia ruptura da cápsula, com uma média de 3,7 linfonodos comprometidos.

Tabela 2. Dados clinicopatológicos, demográficos e de estilo de vida dos pacientes portadores de CEC bucal incluídos neste estudo.

Variáveis – descrições gerais		n (%)
Idade	≤ 59,2 anos	22 (53,66)
	> 59,2 anos	19 (46,34)
Gênero	Masculino	35 (85,37)
	Feminino	6 (14,63)
Raça	Branca	36 (87,8)
	Não Branca	5 (12,2)
Hábito de fumar	Sim	30 (76,92)
	Não	9 (23,08)
Consumo de álcool	Sim	29 (76,31)
	Não	9 (23,69)
Estadiamento T	T1+T2	21 (52,5)
	T3+T4	19 (47,5)
Linfonodos	N0	20 (48,78)
	N+	21 (51,22)
Extensão para outros locais	Não	10 (33,33)
	Sim	20 (66,67)
Grau histológico	I (bem diferenciado)	13 (31,71)
	II (moderadamente)	25 (60,98)
	III (pouco diferenciado)	3 (7,31)
Invasão vascular	Não	36 (90)
	Sim	4 (10)
Invasão linfática	Não	29 (72,5)
	Sim	11 (27,5)
Invasão perineural	Não	18 (45)
	Sim	22 (55)
Recorrência local	Não	31 (75,61)
	Sim	10 (24,39)
Recorrência regional	Não	17 (41,46)
	Sim	24 (58,54)
Recorrência a distância	Não	31 (75,61)
	Sim	10 (24,39)
Morte	Não	22 (53,66)
	Sim	19 (46,34)

5.4. Presença de recorrências locais e metástases

O tempo médio de detecção das recorrências do tumor foi de 11,4 meses após o início do tratamento. Dos casos que recorreram 10 (24,39%) foram recidivas locais, enquanto que em 24 (58,54%) a recorrência foi nos linfonodos regionais e em 10 casos (24,39%) a recorrência foi à distância (Figura 12, Tabela 2). Dos pacientes que tiveram metástases a distância, 5 foram nos pulmões, 2 em ossos e 3 em outras regiões, como o cérebro ou a pele, sendo que em 3 pacientes foram detectadas metástases em mais de uma região simultaneamente.

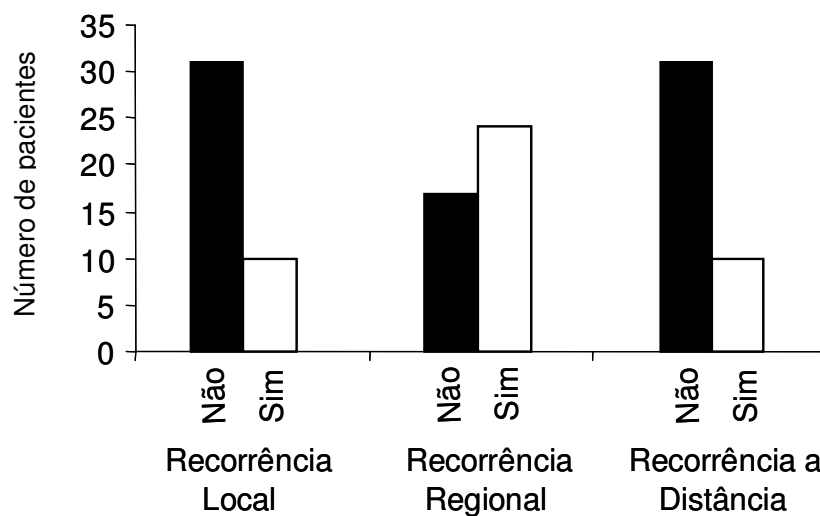


Figura 12. Distribuição das recorrências dos CECs de boca de acordo com a localização.

5.5. Análises imunohistoquímicas

A expressão das proteínas FAS, ErbB2 e Ki-67 foi estudada através de reações imunohistoquímicas nos 41 casos incluídos neste trabalho. A produção de RA foi inicialmente avaliada em um subgrupo de tumores, o qual foi totalmente negativo, apesar das diversas formas de recuperação antigênica aplicadas. Assim, a expressão da proteína RA não foi avaliada em todos os casos deste trabalho.

5.5.1. Expressão de FAS

As reações para detecção da enzima FAS tiveram, em todas as amostras, um padrão de positividade citoplasmático (Figuras 13 A, B e C), sendo a intensidade de marcação fraca e restrita a camada basal no tecido normal adjacente (Figura 13 B). A grande maioria dos casos (34 pacientes ou 82,93%) foi positiva para FAS e 7 tumores (17,07%) foram considerados negativos. Dos casos positivos, 19 (46,34%) tiveram a intensidade de marcação considerada fraca e 15 (36,59%) foram fortemente positivos, principalmente em áreas bem diferenciadas. Para a realização das correlações estatísticas, houve necessidade de agrupar os casos negativos com os casos que mostraram padrão de marcação fraca para FAS, perfazendo um total de 26 casos (63,41%) (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados das reações imunohistoquímicas segundo padrão de marcação.

Variáveis		n (%)
FAS – Positividade	Negativa	7 (17,07)
	Positiva	34 (82,93)
FAS - Intensidade	0 + 1	26 (63,41)
	2	15 (36,59)
ErbB2 – Membrana positividade	Negativa	7 (17,07)
	Positiva	34 (82,93)
ErbB2 – Membrana intensidade	0 + 1	26 (63,41)
	2	15 (36,59)
ErbB2 – Citoplasma intensidade	0 + 1	22 (53,66)
	2	19 (46,34)
Ki-67	≤ 29,5	21 (51,22)
	> 29,5	20 (48,78)

0 + 1: Intensidade de marcação negativa ou fraca

2: Intensidade de marcação moderada e forte

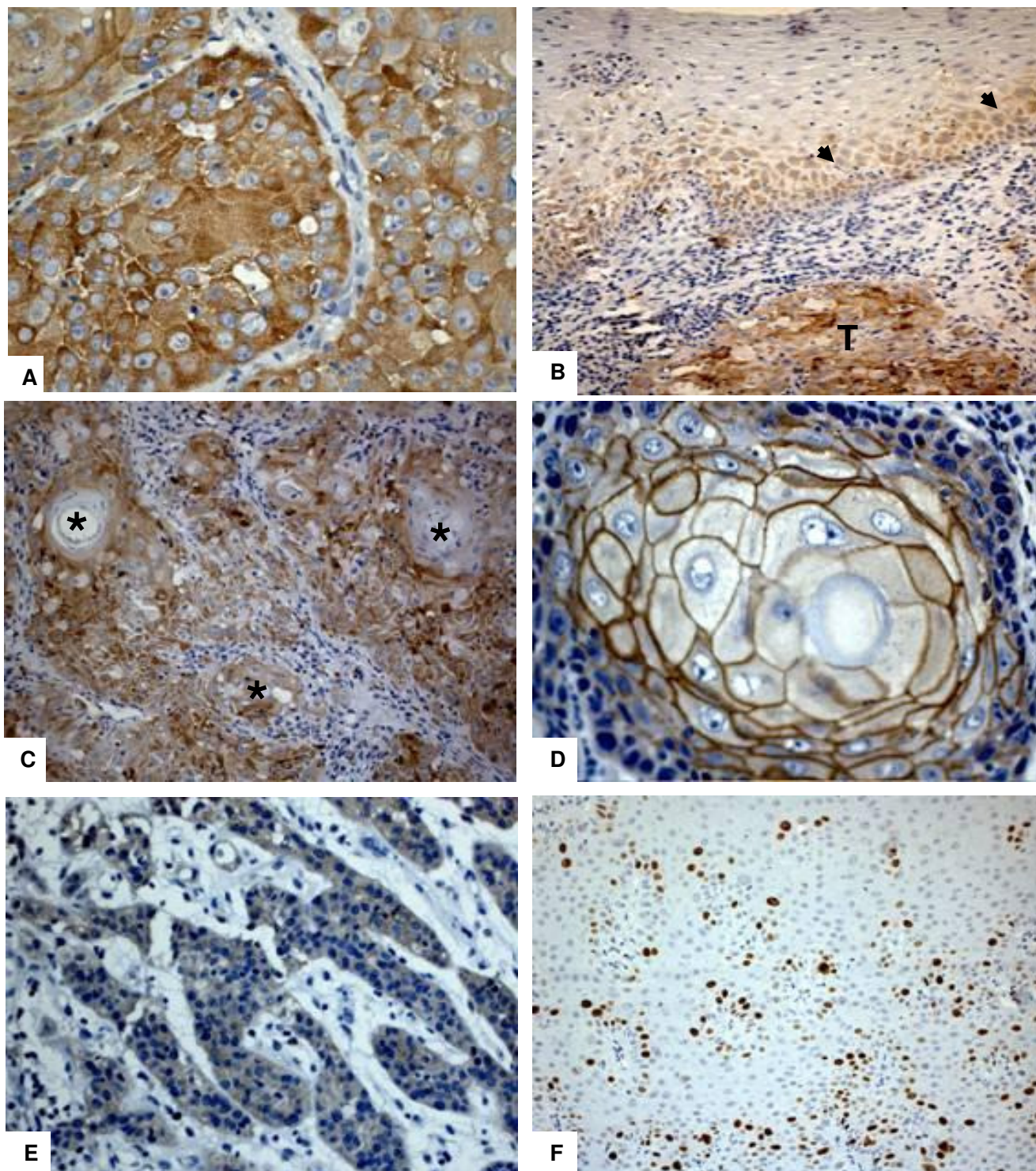


Figura 13. A maioria das amostras de CEC mostrou intensa marcação citoplasmática (A, B e C). A expressão de FAS no epitélio normal adjacente ao tumor foi fraca ou ausente, estando mais evidente nas camadas mais profundas do epitélio (B). ErbB2 apresentou dois padrões distintos de positividade: uma marcação de membrana (D), observada nas áreas de epitélio normal adjacente e nos locais bem diferenciados do tumor, ou marcação citoplasmática (E), localizada principalmente em lesões indiferenciadas. A expressão nuclear de Ki-67 foi observada em todas as amostras estudadas (F). Aumento original de 200X, exceto nas figuras A e D (400X). ▲ Camada basal do epitélio morfologicamente normal.

5.5.2. Expressão de ErbB2

As reações para detecção de ErbB2 exibiram dois padrões bastante distintos de marcação, um localizado na membrana plasmática (Figura 13 D) e outro com padrão intra-citoplasmático (Figura 13 E). A membrana plasmática foi positiva em 34 casos (82,93%) e negativa em 7 casos (17,07%). Dos casos positivos, 19 (46,34%) foram classificados como fracos e 15 (36,59%) como fortes. Em 19 casos (46,34%) houve marcação positiva no citoplasma, sendo 22 (53,66%) negativos nesta região das células (Figura 14, Tabela 3).

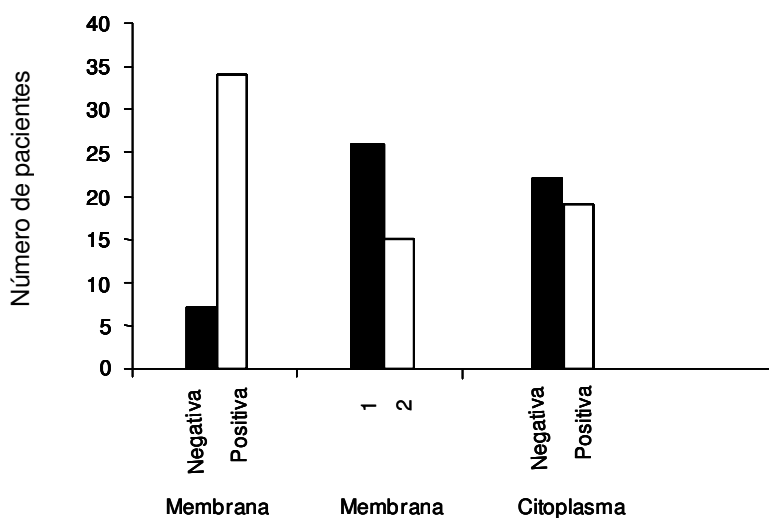


Figura 14. Distribuição dos casos de acordo com a positividade e intensidade da marcação imunohistoquímica para ErbB2.

5.5.3. Expressão de Ki-67

Todos os casos da amostra estudada mostraram positividade nuclear para o antígeno de proliferação Ki-67 (Figura 14 F), sendo que a porcentagem de células positivas variou de 10,8 a 41,4 com média de 29,5. Em 21 casos (51,22%) o índice de positividade foi menor ou igual a 29,5 e em 20 casos (48,78%) maior que 29,5. A coloração nuclear para Ki-67 foi facilmente identificada e todas as células marcadas, independentemente da intensidade (Figura 15, Tabela 3).

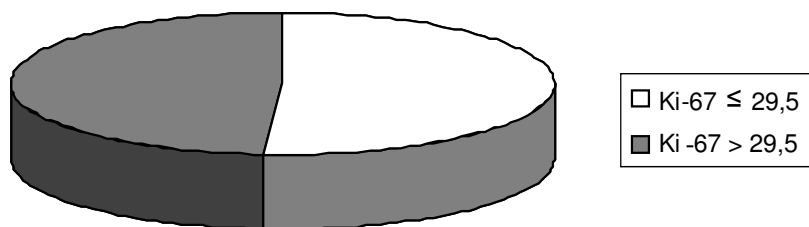


Figura 15. Distribuição dos casos de acordo com a porcentagem de células positivas para o antígeno Ki-67.

5.6. Correlações de frequência

A positividade imunohistoquímica para FAS foi mais intensa nas lesões que apresentaram microscopicamente infiltração linfática ($p=0,035$), espessura maior que 29,0 mm ($p=0,006$) e comprometimento dos linfonodos ($p=0,039$) (Tabela 4). Uma observação importante foi o fato de uma grande porcentagem das células fortemente positivas para FAS (97,06%) serem também intensamente marcadas para ErbB2 em membrana plasmática e Ki-67, com correlação positiva estatisticamente significativa ($p=0,001$ e $p=0,002$, respectivamente).

A marcação positiva para ErbB2 em membrana plasmática, assim como a expressão de FAS, também foi correlacionada com os tumores que apresentaram microscopicamente espessura de lesão maior que 29,0 mm ($p=0,006$) e comprometimento microscópico dos linfonodos ($p=0,024$) (Tabela 4). Um achado interessante foi que a expressão positiva de ErbB2 em membrana foi associada com os tumores que não tiveram extensão para outros locais ($p=0,009$) (Tabela 4). Entretanto, a expressão citoplasmática de ErbB2 foi mais evidente nas lesões que mostraram ruptura da cápsula linfonodal ($p=0,005$). O estudo estatístico dos nossos resultados revelou também uma associação significativa entre a marcação citoplasmática positiva de ErbB2 com a positividade nuclear para o antígeno Ki-67, sendo a quantidade de células positivas maior em pacientes com intensidade de marcação mais forte para ErbB2 no citoplasma ($p=0,001$). Assim, a expressão imunohistoquímica de FAS e ErbB2, foi correlacionada com o potencial proliferativo dos tumores, estimado através do índice de positividade para Ki-67.

Tabela 4. Relação entre a expressão imunohistoquímica de FAS, ErbB2 e Ki-67 com as variáveis clinicopatológicas.

Variáveis clinicopatológicas		FAS		ErbB2 membrana		ErbB2 citoplasma		Ki-67	
		0 + 1	2	0 + 1	2	0 + 1	2	≤ 29,5	> 29,5
Idade	≤ 59,2 anos	13 (50)	9 (60)	16 (61,54)	7 (47,67)	10 (45,45)	12 (63,16)	9 (42,86)	13 (65)
	> 59,2 anos	13 (50)	6 (40)	10 (38,46)	8 (53,33)	12 (54,55)	7 (36,84)	12 (57,14)	7 (35)
Gênero	Masculino	24 (92,31)	11 (73,33)	23 (88,46)	12 (80)	20 (90,91)	15 (78,95)	17 (80,95)	18 (90)
	Feminino	2 (7,69)	4 (26,67)	3 (11,54)	3 (20)	2 (9,09)	4 (21,05)	4 (19,05)	2 (10)
Raça	Branca	24 (92,31)	12 (80)	23 (88,46)	13 (86,67)	18 (81,82)	18 (94,74)	19 (90,48)	17 (85)
	Não Branca	2 (7,69)	3 (20)	3 (11,54)	2 (13,33)	4 (18,18)	1 (5,26)	2 (9,52)	3 (15)
Hábito de fumar	Não	6 (24)	3 (21,43)	6 (24)	3 (21,43)	3 (14,29)	6 (33,33)	6 (30)	3 (15,79)
	Sim	19 (76)	11 (78,57)	19 (76)	11 (78,57)	18 (85,71)	12 (66,67)	14 (70)	16 (84,21)
Consumo de álcool	Não	6 (25)	3 (21,43)	6 (25)	3 (21,43)	4 (20)	5 (27,78)	4 (21,05)	5 (26,32)
	Sim	18 (75)	11 (78,57)	18 (75)	11 (78,57)	16 (80)	13 (72,22)	15 (78,95)	14 (73,68)
Extensão outros locais	Não	6 (28,57)	4 (44,44)	5 (23,81)	5 (55,56)♣	7 (43,75)	3 (21,43)	5 (31,25)	5 (35,71)
	Sim	15 (71,43)	5 (55,56)	16 (76,19)	4 (44,44)	9 (56,25)	11 (78,57)	11 (68,75)	9 (64,29)
Estadiamento T	T1+T2	13 (52)	8 (53,33)	11 (44)	10 (66,67)	11 (50)	10 (55,56)	12 (57,14)	9 (47,37)
	T3+T4	12 (48)	7 (46,67)	14 (56)	5 (33,33)	11 (50)	8 (44,44)	9 (42,86)	10 (52,63)
Linfonodos	N0	15 (57,69)	5 (33,33)	14 (53,85)	6 (40)	13 (59,09)	7 (36,84)	12 (57,14)	8 (40)
	N+	11 (42,31)	10 (66,67)	12 (46,15)	9 (60)	9 (40,91)	12 (63,16)	9 (42,86)	12 (60)
Grau histológico	I	12 (46,15)	4 (26,67)	13 (50)	3 (20)	10 (45,45)	6 (31,58)	11 (52,38)	5 (25)
	II	11 (42,31)	10 (66,67)	10 (38,46)	11 (73,33)	10 (45,45)	11 (57,89)	8 (38,1)	13 (65)
	III	3 (11,54)	1 (6,66)	3 (11,54)	1 (6,67)	2 (9,1)	2 (10,53)	2 (9,52)	2 (10)
Invasão vascular	Não	23 (92)	13 (86,67)	23 (92)	13 (86,67)	19 (90,48)	17 (89,47)	20 (95,24)	16 (84,21)
	Sim	2 (8)	2 (13,33)	2 (8)	2 (13,33)	2 (9,52)	2 (10,53)	1 (4,76)	3 (15,79)
Invasão linfática	Não	21 (84)	8 (53,33) *	19 (76)	10 (66,67)	15 (71,43)	14 (73,68)	17 (80,95)	12 (63,16)
	Sim	4 (16)	7 (46,67)	6 (24)	5 (33,33)	6 (28,57)	5 (26,32)	4 (19,05)	7 (36,84)
Invasão perineural	Não	11 (44)	7 (46,67)	10 (40)	8 (53,33)	12 (57,14)	6 (31,58)	10 (47,62)	8 (42,11)
	Sim	14 (56)	8 (53,33)	15 (60)	7 (46,67)	9 (42,86)	13 (68,42)	11 (52,38)	11 (57,89)
Espessura da lesão	≤ 29,0 mm	15 (65,22)	3 (20) ♣	15 (65,22)	3 (20) ♣	9 (47,37)	9 (47,37)	12 (63,16)	6 (31,58)
	> 29,0 mm	8 (34,78)	12 (80)	8 (34,78)	12 (80)	10 (52,63)	10 (52,63)	7 (36,84)	13 (68,42)
Comprometimento dos linfonodos	Não	10 (71,43)	5 (41,67)*	12 (75)	3 (30)*	9 (50)	6 (75)	7 (63,64)	8 (53,33)
	Sim	4 (28,57)	7 (58,33)	4 (25)	7 (70)	9 (50)	2 (25)	4 (36,36)	7 (46,67)

* p<0,05; ♣p<0,01; 0 + 1: Marcação negativa +positiva fraca; 2: Marcação positiva forte

5.7. Situação clínica dos pacientes até a data da última informação obtida

O tempo de seguimento dos pacientes que compuseram esta amostra variou de 3,9 a 102 meses, com uma média de 33,8 meses. De acordo com a última informação obtida (10/2006), 19 pacientes (46,34%) evoluíram para óbito, sendo 18 (43,9%) devido à doença e 1 (2,44%) durante o tratamento. Dos pacientes vivos, 22 (53,66%) estavam livres da doença. Nenhum caso foi perdido de vista, ou seja, não houve caso em que não se conseguiu nenhuma informação do paciente após o tratamento (Figura 16).



Figura 16. Distribuição dos casos de CEC de boca, de acordo com a situação clínica da última avaliação.

5.8. Tempo de sobrevida global

A sobrevida global, ou seja, o intervalo de tempo entre a cirurgia e a morte do paciente, em 5 anos de acompanhamento clínico, foi de 47% (Figura 17). Portanto, de acordo com a última informação obtida, 22 pacientes (53,66%) se encontram vivos e 19 (46,34%) mortos (Figura 17).

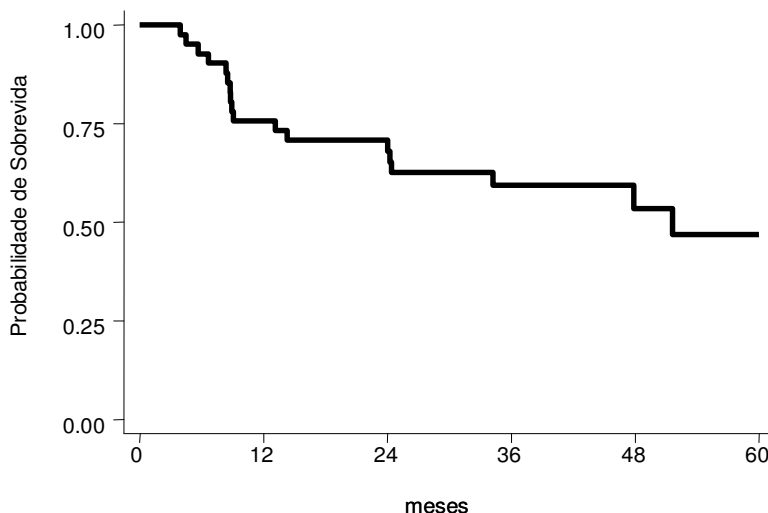


Figura 17. Análise de sobrevida global para todos os casos, de acordo com o tempo de seguimento.

Pôde ser observado que os pacientes que tiveram o estadiamento clínico avançado T3 + T4 ($p=0,0107$) (Figura 18), linfonodo positivo N+ ($p=0,0328$) (Figura 19) e que apresentaram microscopicamente embolização linfática de células neoplásicas ($p=0,0343$) (Figura 20), espessura de lesão maior que 29,0 mm ($p=0,0316$) (Figura 21), comprometimento de linfonodos ($p=0,205$) (Figura 22) ou ruptura de cápsula linfonodal ($p=0,0253$) (Figura 23) evoluíram mais rapidamente para óbito (Tabela 5).

Com relação as reações imunohistoquímicas, foi detectada associação estatisticamente significativa nos tumores que tiveram maior intensidade de marcação para FAS ($p=0,0062$) (Figura 24). Um menor tempo de sobrevida global, também foi correlacionado com a intensidade da marcação de ErbB2 na membrana plasmática ($p=0,0005$) (Figura 25) e uma tendência de menor tempo de sobrevida foi observado para os casos com intensidade de marcação de ErbB2 em citoplasma ($p=0,0705$) (Figura 26, Tabela 5).

As análises confirmaram que os pacientes com índice de positividade para o antígeno de proliferação celular Ki-67 menor ou igual a 29,5 tiveram sobrevida mais longa em comparação com aqueles com índice maior que 29,5 ($p<0,0001$) (Figura 27, Tabela 5).

Tabela 5: Análise da sobrevida global de acordo com as variáveis estatisticamente significativas.

Variáveis clinicopatológicas		Sobrevida acumulada (%)				p
		1 ano	3 anos	4 anos	5 anos	
Estadiamento T	T1+T2	85,71	69,27	59,38	35,63	0,0107
	T3+T4	68,42	62,72	49,52	38,51	
Estadiamento N	N0	90	73,81	73,81	59,05	0,0328
	N+	61,9	43,33	34,67	34,67	
Invasão linfática	Não	82,76	70,97	64,21	64,21	0,0343
	Sim	54,55	24,79	24,79	24,79	
Espessura da lesão	≤ 29,0 mm	88,89	74,07	60,61	60,61	0,0316
	> 29,0 mm	60	49,57	37,9	37,9	
Comprometimento dos linfonodos	Não	73,33	65,19	55,16	55,16	0,0205
	Sim	45,45	35,35	11,78	11,78	
Ruptura de cápsula	Não	93,75	87,05	78,35	78,35	0,0253
	Sim	80	60	50	26,92	
FAS	0	88,46	74,71	67,59	54,07	0,0062
	1	53,33	46,67	31,11	31,11	
ErbB2 membrana	0	88,46	78,63	71,48	58,49	0,0005
	1	53,33	40	25,45	25,45	
ErbB2 citoplasma	0	86,36	70,32	62,91	52,43	0,0705
	1	63,16	57,67	44,85	44,85	
Ki-67	≤ 29,5	100	81,82	81,92	81,92	0,0001
	> 29,5	50	34,29	26,67	16	

0: Negativa + positiva fraca; 1: Positiva Forte

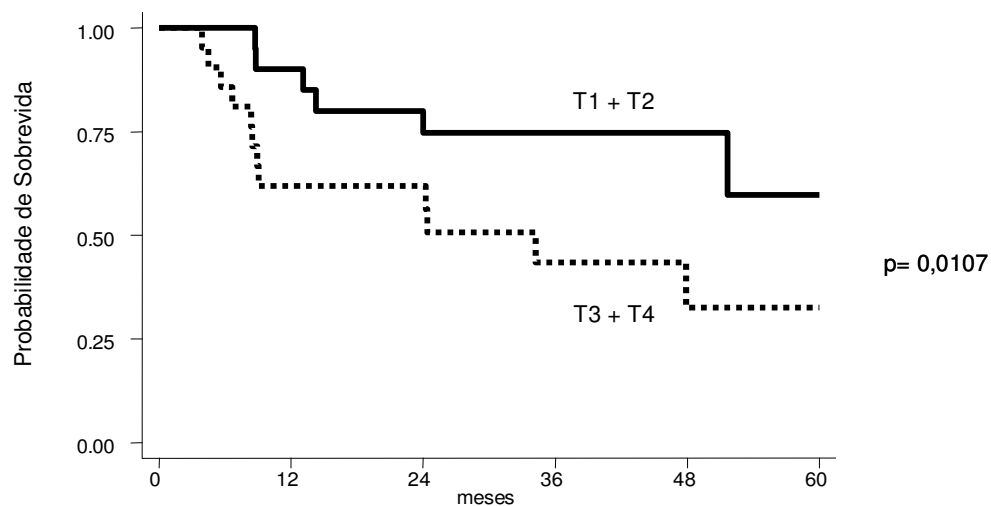


Figura 18. Análise de sobrevida global de acordo com estadiamento clínico T do tumor.

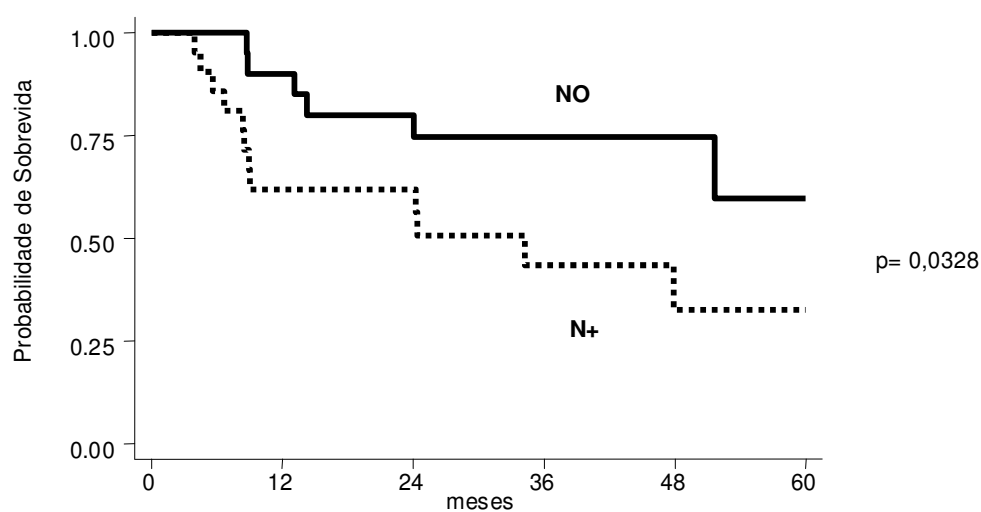


Figura 19. Análise de sobrevida global de acordo com estadiamento clínico N do tumor.

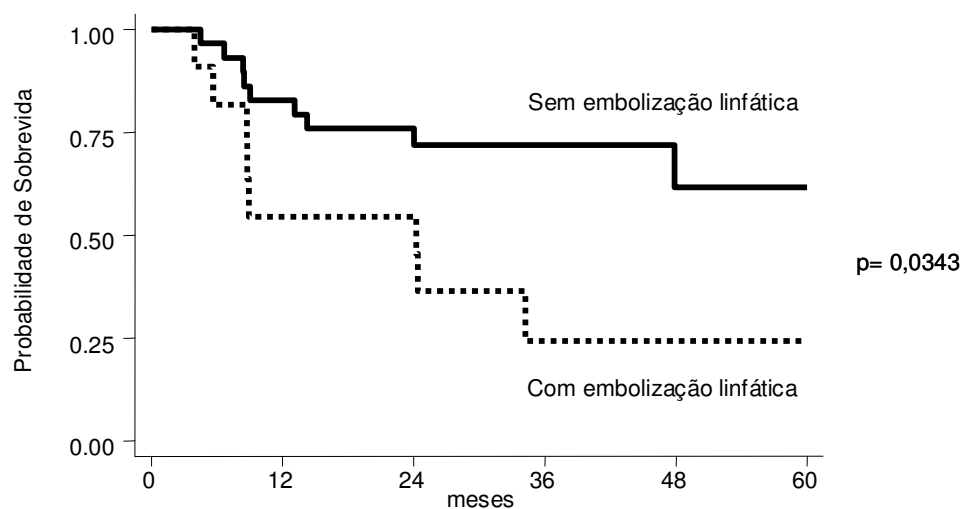


Figura 20. Análise de sobrevida global de acordo com embolização linfática.

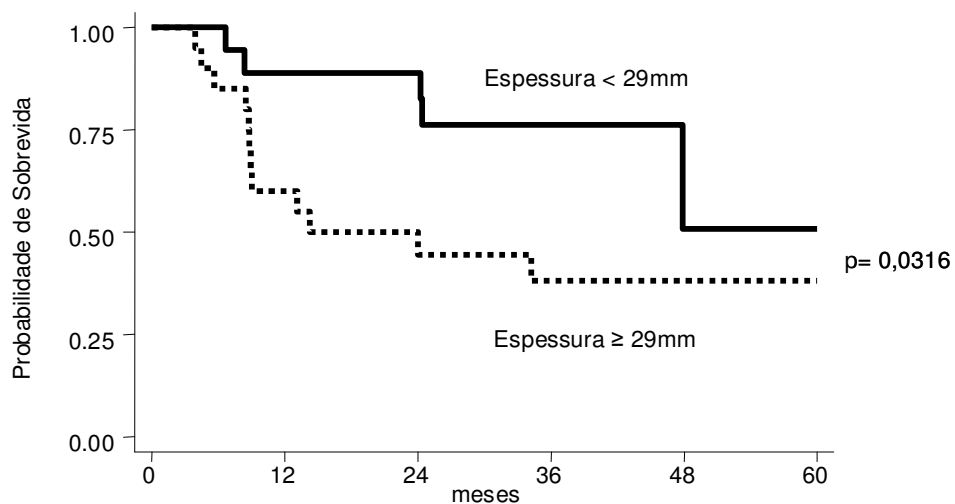


Figura 21. Análise de sobrevida global de acordo com a espessura da lesão.

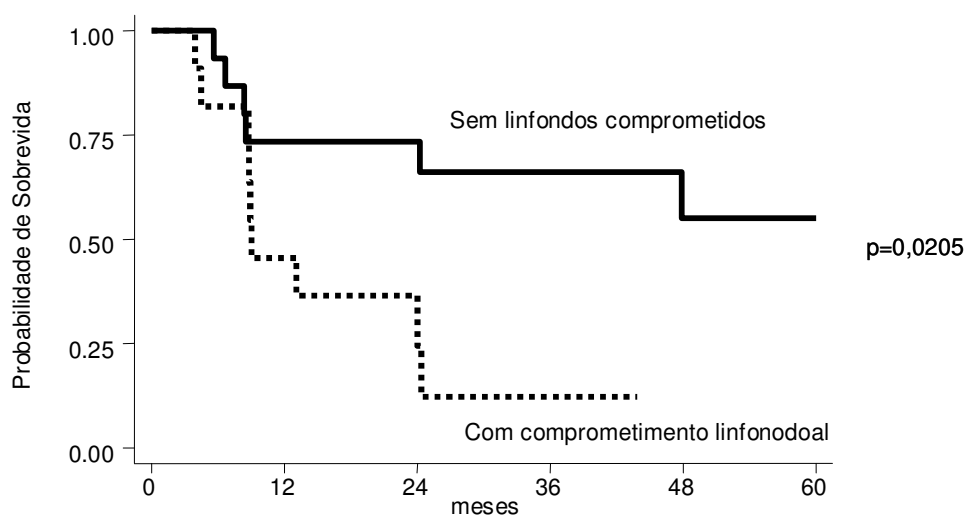


Figura 22. Análise de sobrevida global de acordo o comprometimento de linfonodos.

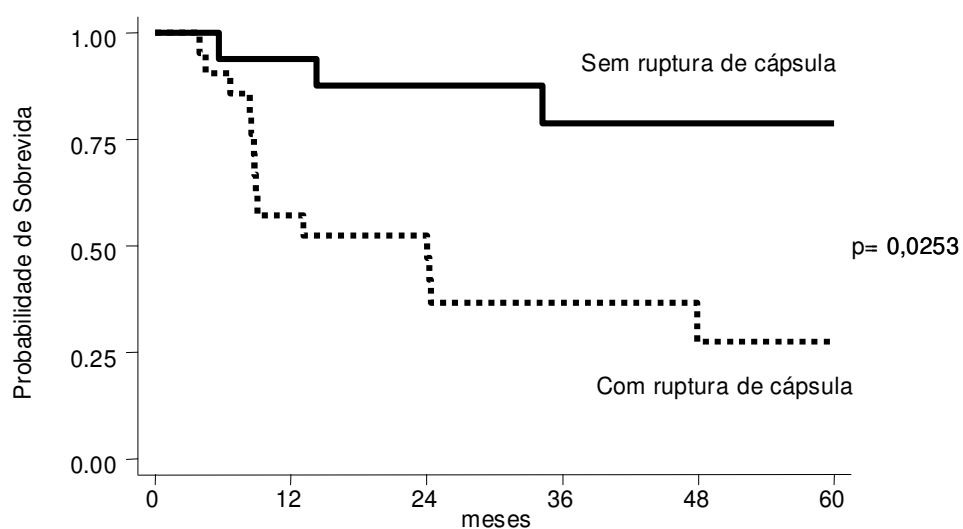


Figura 23. Análise de sobrevida global de acordo com a ruptura de cápsula linfonodal.

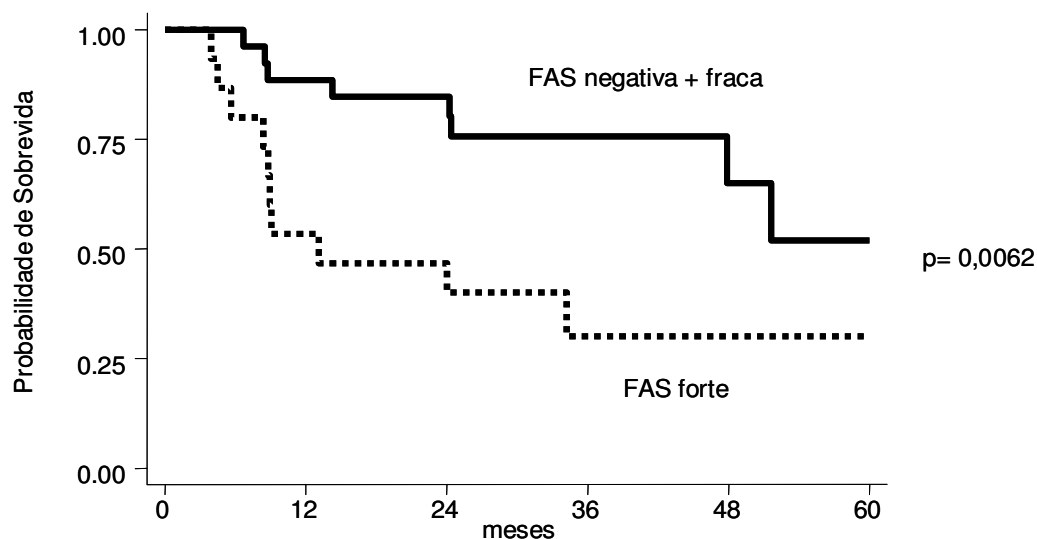


Figura 24. Análise de sobrevida global de acordo com a intensidade de marcação imunohistoquímica para FAS.

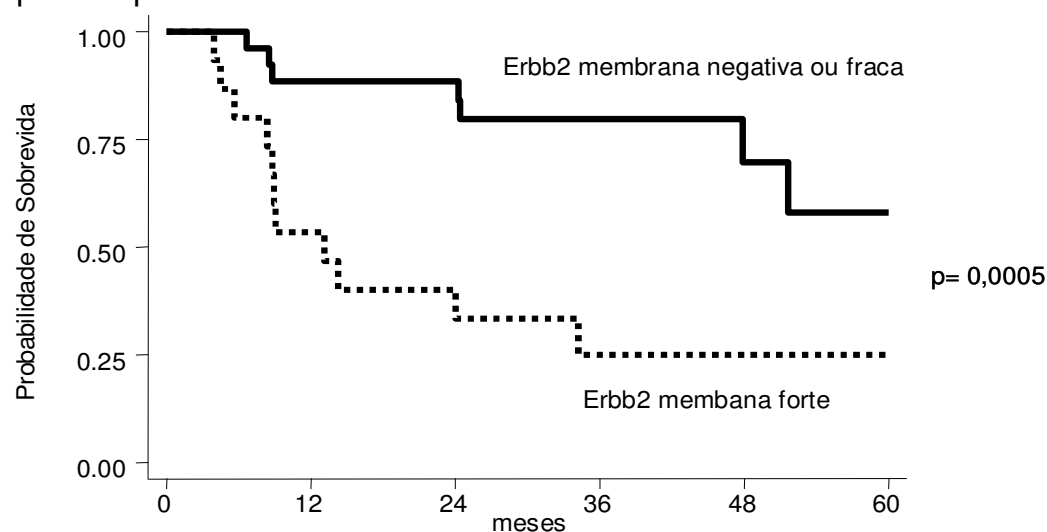


Figura 25. Análise de sobrevida global de acordo com a intensidade de marcação imunohistoquímica para ErbB2 em membrana plasmática.

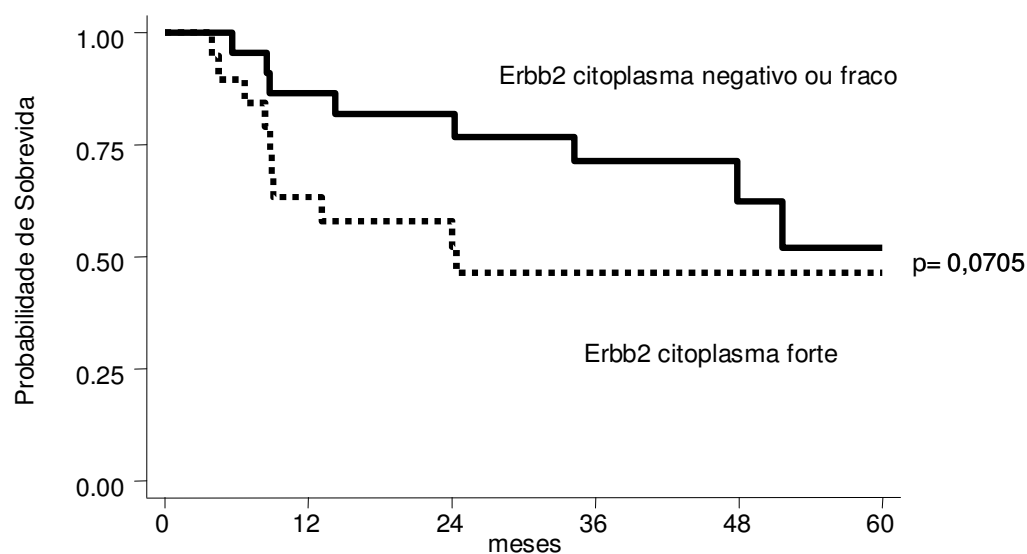


Figura 26. Análise de sobrevida global de acordo com a intensidade de marcação imunohistoquímica para ErbB2 em citoplasma.

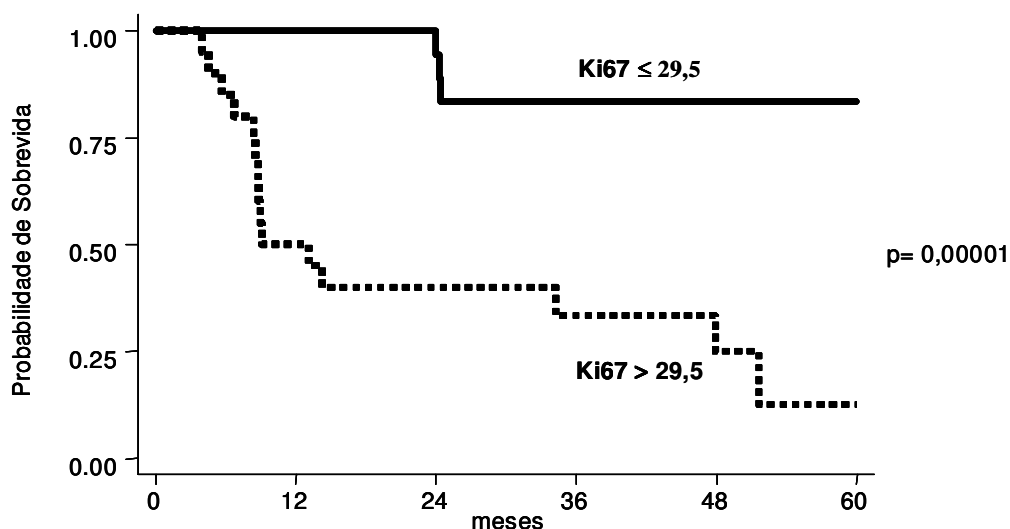


Figura 27. Análise de sobrevida global de acordo com a positividade de Ki-67.

5.9. Tempo de sobrevida livre de doença

O tempo de sobrevivência livre de doença, ou seja, o tempo de acompanhamento no qual o paciente permaneceu sem recorrências locais ou metástases foi em média de 8,9 meses após o início do tratamento. A sobrevida livre de doença após 5 anos de acompanhamento foi de 52,47% (Figura 28). Dos 41 pacientes incluídos neste trabalho, 20 (48,78%) tiveram recorrência local, regional ou à distância.

Foi observado menor tempo de sobrevida livre de doença nos pacientes com estadiamento clínico avançado T3 + T4 ($p=0,0122$) (Figura 29) e N+ ($p=0,0623$) (Figura 30). Segundo as correlações estatísticas, houve maior recorrência ou metástases entre os pacientes que apresentaram microscopicamente embolização linfática de células neoplásicas ($p=0,0110$) (Figura 31), espessura de lesão maior que 29,0 mm ($p=0,0212$) (Figura 32), comprometimento de linfonodos ($p=0,019$) (Figura 33) e ruptura da cápsula linfonodal ($p=0,0003$) (Figura 34, Tabela 6).

Com relação as reações imunohistoquímicas, foram detectadas associação estatisticamente significativa nos tumores que tiveram maior intensidade de marcação para FAS ($p=0,0011$) (Figuras 35). O menor tempo de sobrevida livre de doença, também foi correlacionado com a intensidade da

marcação de ErbB2 em membrana plasmática ($p=0,0056$) (Figura 36) e uma tendência de menor tempo de sobrevida foi observado para os casos com intensidade de marcação de ErbB2 em citoplasma ($p=0,0815$) (Figura 37, Tabela 5).

As análises confirmaram que os pacientes com índice de positividade para o antígeno de proliferação celular Ki-67 menor ou igual a 29,5 tiveram um período de recorrência da lesão mais longo comparado com aqueles cujo índice foi maior que 29,5 ($p = 0,0004$) (Figura 38, Tabela 6).

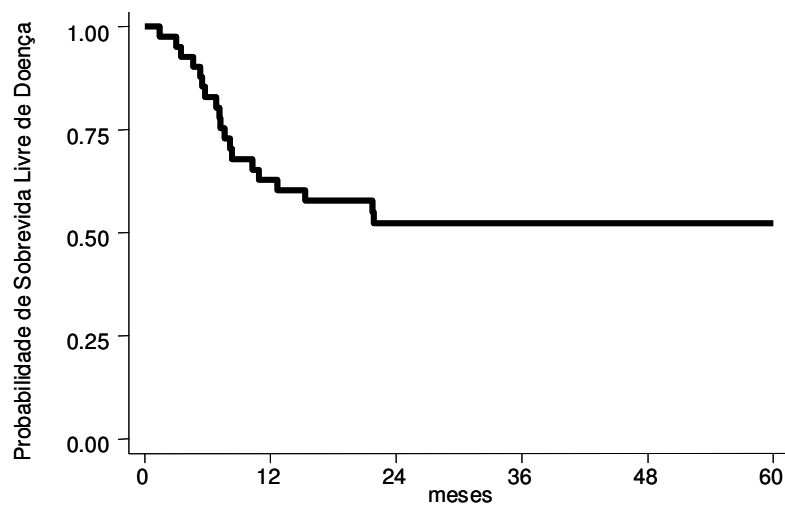


Figura 28. Análise de sobrevida livre de doença para todos os casos, de acordo com o tempo de seguimento.

Tabela 6: Análise da sobrevida livre de doença de acordo com as variáveis estatisticamente significativas.

Variáveis clinicopatológicas		Sobrevida acumulada (%)				p
		1 ano	3 anos	4 anos	5 anos	
Estadiamento T	T1+T2	71,43	61,58	61,58	61,58	0,0122
	T3+T4	56,76	44,81	44,81	44,81	
Estadiamento N	N0	70,00	64,81	64,81	64,81	0,0623
	N+	56,10	40,07	40,07	40,07	
Invasão linfática	Não	68,97	65,34	65,34	65,34	0,0110
	Sim	42,86	10,71	10,71	10,71	
Espessura da lesão	≤ 29,0	77,78	65,81	65,81	65,81	0,0212
	> 29,0	43,59	32,69	32,69	32,69	
Comprometimento dos linfonodos	Não	58,62	50,8	50,8	50,8	0,019
	Sim	27,27	9,09	9,09	9,09	
Ruptura de cápsula	Não	93,55	86,35	86,35	86,35	0,0003
	Sim	40,0	31,25	12,5	12,5	
FAS	0	73,08	69,02	69,02	69,02	0,0011
	1	44,83	22,41	22,41	22,41	
ErbB2 membrana	0	73,08	64,96	64,96	64,96	0,0056
	1	44,83	29,89	29,89	29,89	
ErbB2 citoplasma	0	72,09	62,15	62,15	62,15	0,0815
	1	52,63	41,55	41,55	41,55	
Ki-67	≤ 29,5	85,71	75,63	75,63	75,63	0,0004
	> 29,5	38,46	27,47	27,47	27,47	

0: Negativa + positiva fraca; 1: Positiva Forte

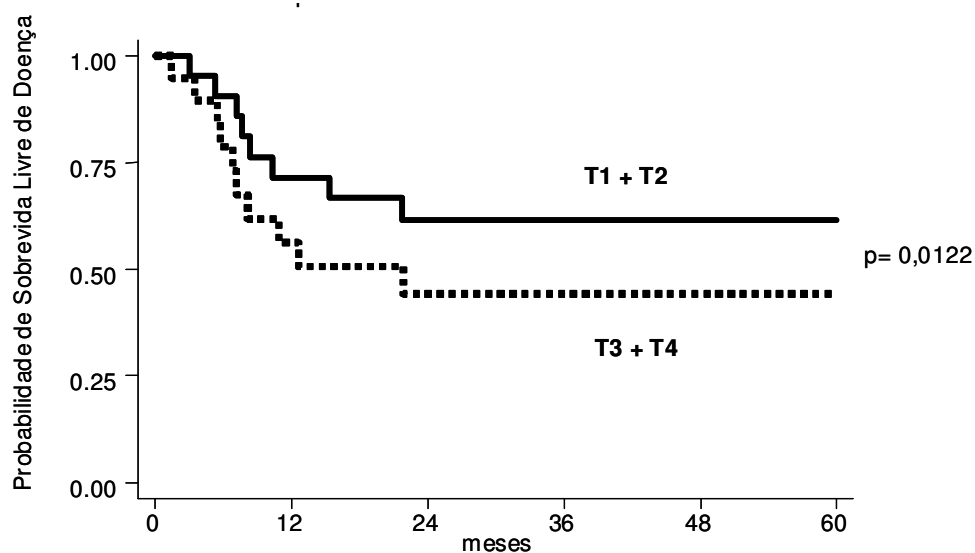


Figura 29. Análise de sobrevida livre de doença de acordo com o estadiamento clínico T.

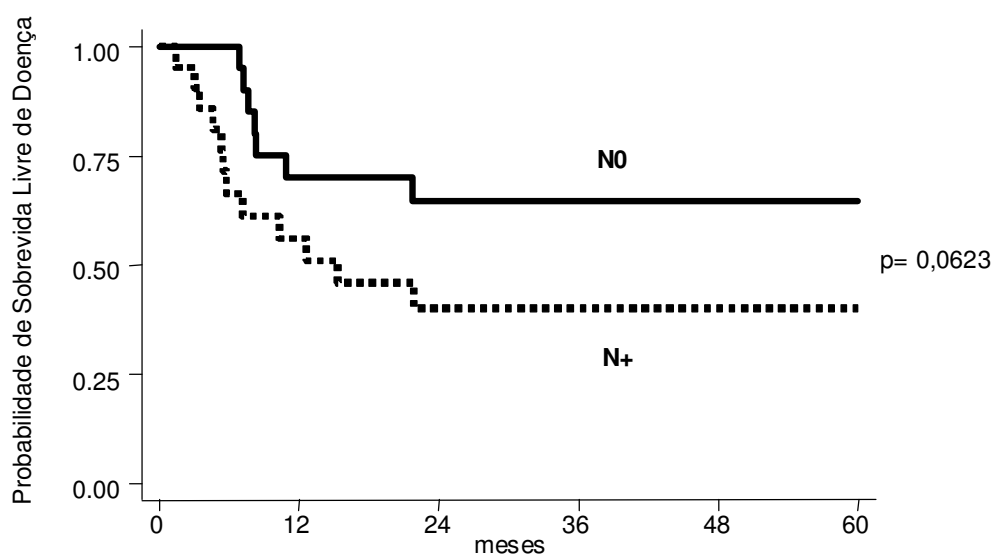


Figura 30. Análise de sobrevida livre de doença de acordo com o estadiamento clínico N.

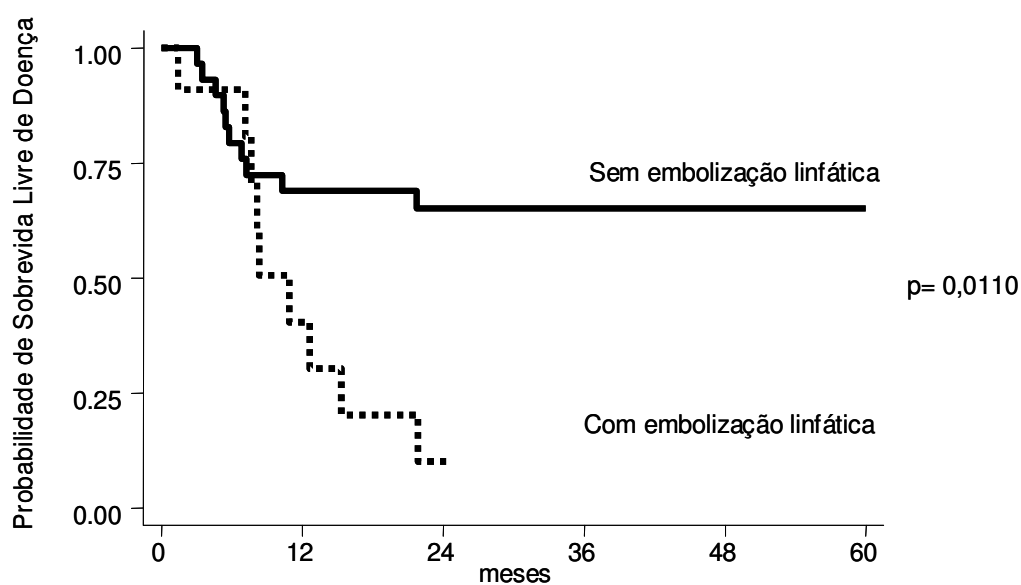


Figura 31. Análise de sobrevida livre de doença de acordo com a embolização linfática.

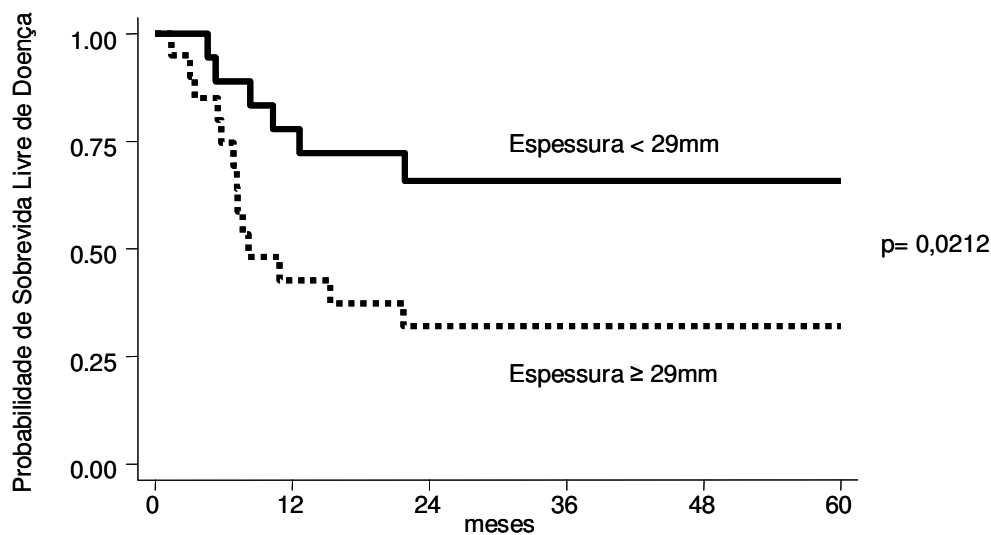


Figura 32. Análise de sobrevida livre de doença de acordo com a espessura da lesão.

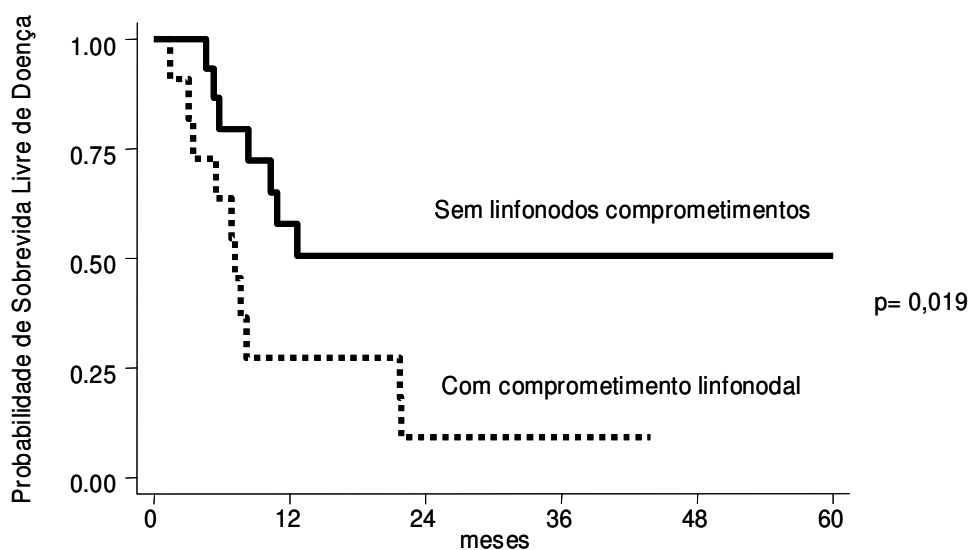


Figura 33. Análise de sobrevida livre de doença de acordo com comprometimento de linfonodos

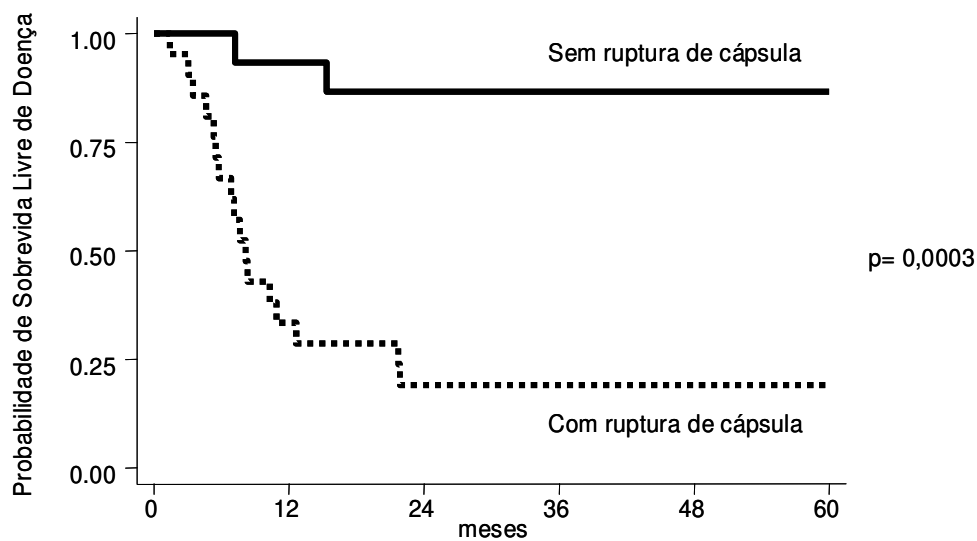


Figura 34. Análise de sobrevida livre de doença de acordo com a ruptura de cápsula linfonodal.

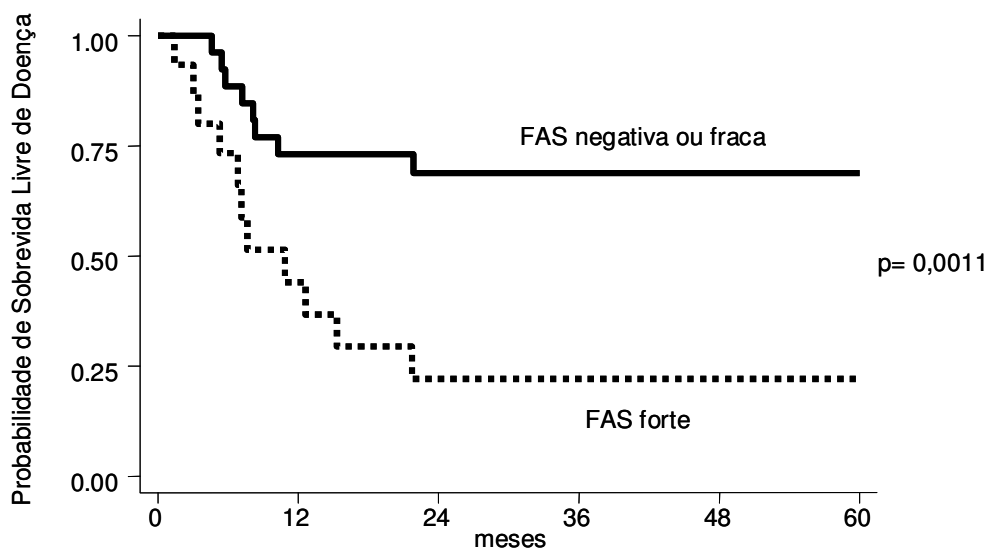


Figura 35. Análise de sobrevida livre de doença de acordo com a intensidade de marcação imunohistoquímica para FAS.

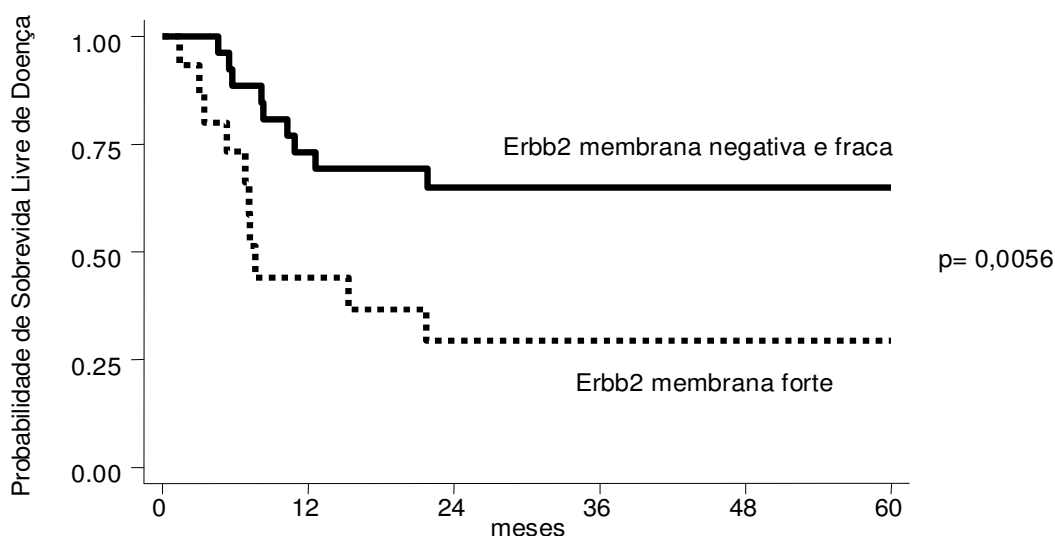


Figura 36. Análise de sobrevida livre de doença de acordo com a intensidade de marcação imunohistoquímica para ErbB2 em membrana plasmática.

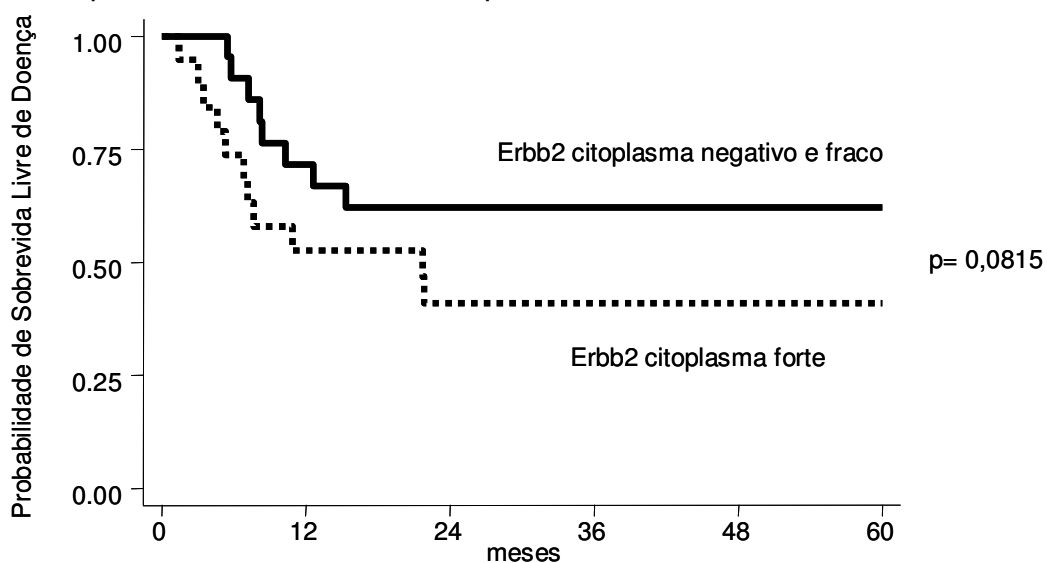


Figura 37. Análise de sobrevida livre de doença de acordo com a intensidade de marcação imunohistoquímica para ErbB2 citoplasma.

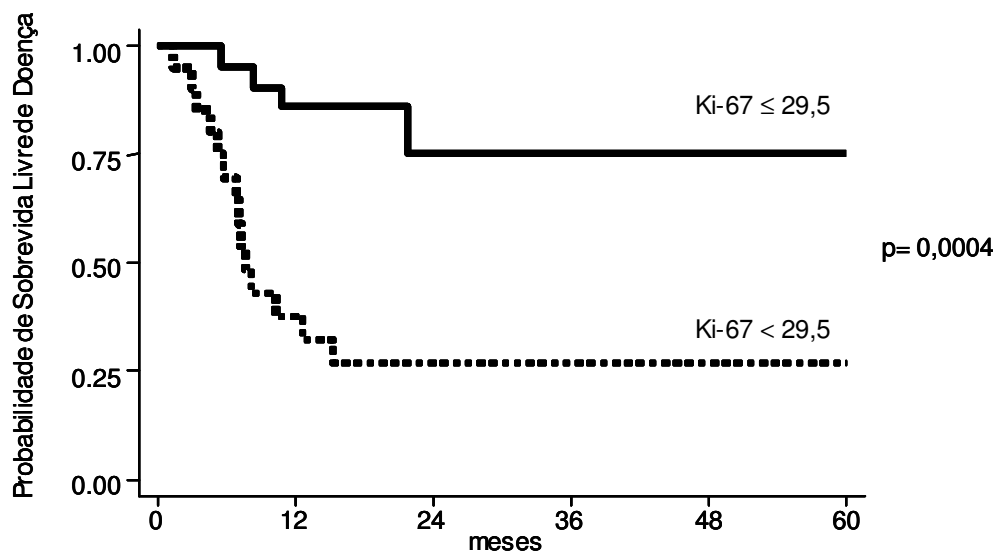


Figura 38. Análise de sobrevida livre de doença de acordo com a positividade para o antígeno Ki-67.

5.10. Obtenção das amostras microdissecadas a *laser*

Todas as amostras pareadas selecionadas para este estudo foram microdissecadas a *laser*. *Laser Capture Microdissection* (LCM) é uma metodologia capaz de aumentar sensivelmente a acurácia e a sensibilidade dos estudos moleculares, por possibilitar a extração de uma população celular homogênea e pura de um tecido morfologicamente complexo, garantindo que apenas as células de interesse sejam isoladas (Figuras 39 e 40).

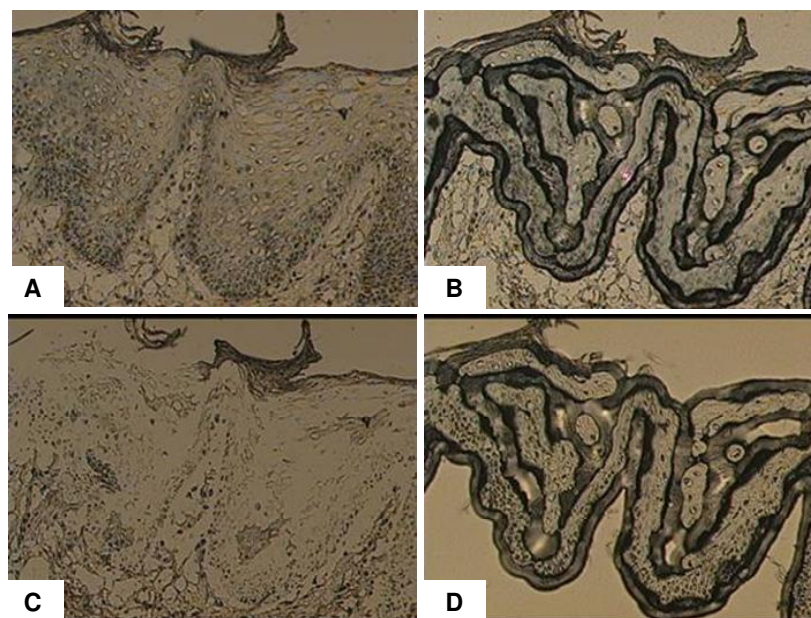


Figura 39. Fotografias representativas da microdissecção em tecido epitelial morfológicamente normal adjacente ao tumor. (A) Tecido preparado e corado com Azul de Toluidina; (B) tecido epitelial de interesse selecionado por pulsos de raio *laser* infravermelho, que provoca expansão do *cap* e adesão das células a ele. O *cap* ao ser removido deixa uma área negativa (C) que corresponde ao epitélio que ficou aderido após a microdissecção (D).

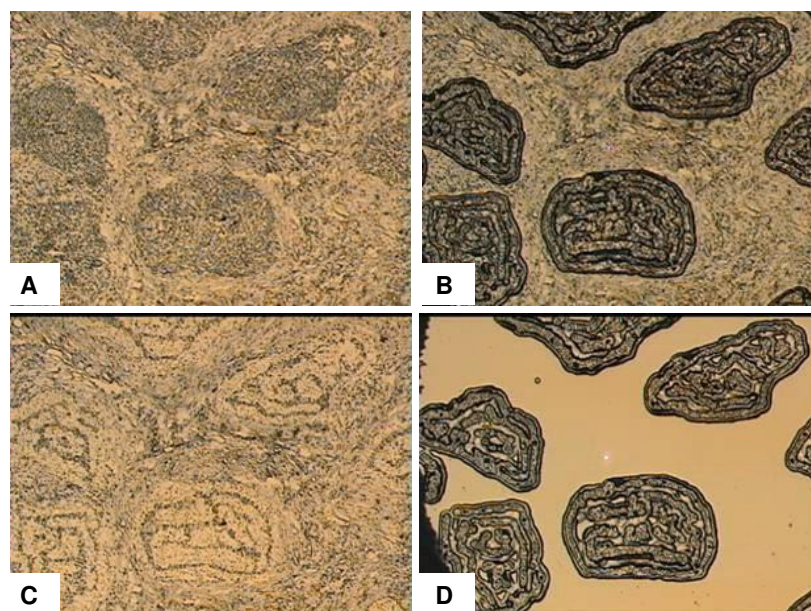


Figura 40. Fotografias representativas da microdissecção em amostra de CEC. (A) Áreas tumorais coradas com Azul de Toluidina; (B) ilhas de tecido epitelial selecionadas sendo separadas do estroma de tecido conjuntivo, rico em células inflamatórias. O *cap* ao ser removido deixa áreas negativas (C), correspondentes as células que ficaram aderidas ao *cap* (D).

5.10.1. Qualidade e quantidade das amostras de tecido obtidas por microdissecção a *laser*

Todas as amostras microdissecadas a *laser* foram submetidas a amplificação do RNA mensageiro para a obtenção de quantidade de RNA amplificado (RNAa) suficiente para os experimentos de qRT-PCR. A qualidade destas amostras foi avaliada por uma reação de RT-PCR convencional para o gene NOTCH2, visando amplificar a região entre 5107 e 5320 pb da região 5' do RNA mensageiro. Desta forma, o aparecimento do produto de 231 pb demonstrou eficiência da reação de transcrição e integridade do RNA mensageiro (Figura 41). Somente as amostras que apresentaram resultado positivo na reação de PCR foram submetidas a qRT-PCR.

A quantificação do cDNA das amostras submetidas a amplificação do RNA foi feita pela leitura em espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000) e a quantidade obtida variou de 10,07 ng/μl a 145,46 ng/μl, com média de 49,56 ng/μl.

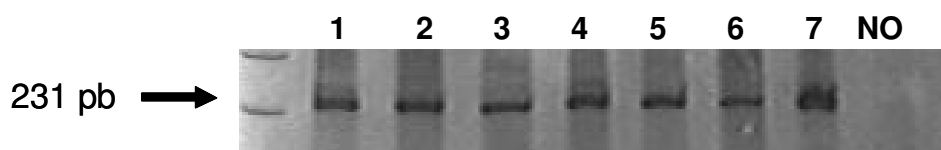


Figura 41. Verificação da qualidade do RNA amplificado, após síntese de cDNA. Visualização em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% impregnado com nitrato de prata. As canaletas de 1 a 7 correspondem as amostras de cDNA obtidas de tecido microdissecado a *laser*, avaliadas pela expressão do gene NOTCH2. A canaleta 8 corresponde ao controle negativo da reação (NO).

5.11. qRT-PCR

Para garantir que as amostras poderiam ser submetidas à metodologia de amplificação do RNA mensageiro sem que fossem introduzidos artefatos aos experimentos de qRT-PCR, foi necessário investigar a reprodutibilidade, sensibilidade e a manutenção da quantidade relativa dos transcritos antes e após a amplificação do RNA. Os resultados obtidos comparando RNAs

amplificados em um ciclo foram similares aos resultados dos RNAs não amplificados, o que nos permitiu usar amostras amplificadas para a realização dos experimentos de qRT-PCR.

5.11.1. Padronização das concentrações de cDNA e de *primers*

Dos *primers* utilizados nos experimentos de qRT-PCR, ACTB, GAPDH, HPRT1, BCRP, AR e ErbB2 foram desenhados manualmente e as seqüências obtidas checadas para avaliação de estruturas secundárias com o auxílio do programa *OLIGOTECH* versão 1.00. Os *primers* para os genes FAS e USP2a foram desenhados no laboratório do Dr. Massimo Loda, do Dana-Farber Cancer Institute (Harvard Medical School, Boston, EUA). Todas as reações foram realizadas no aparelho *ABI Prism™ 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Para avaliar a expressão diferencial dos transcritos selecionados, foi utilizado o sistema *SYBR® Green* e o método de quantificação relativa, adotando como amostra referência o cDNA do tecido morfológicamente normal pareado a amostra tumoral em análise.

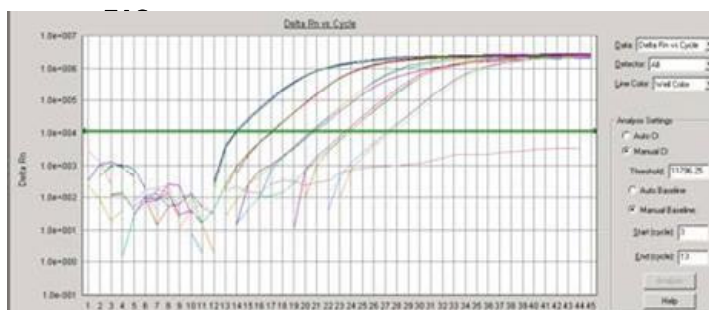
Para a padronização das reações, diferentes concentrações de *primers* (100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM) e de quantidades de cDNA (1 ng, 2 ng, 4 ng) foram utilizadas. A especificidade das reações foi avaliada por meio da curva de dissociação do fragmento amplificado, seguida por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%. As concentrações adequadas de cada um dos *primers* para cada transcrito estão listadas na Tabela 1 (Materiais e Métodos) e a quantidade de cDNA padronizada foi de 2 ng.

5.11.2. Eficiência dos *primers* e especificidade dos fragmentos

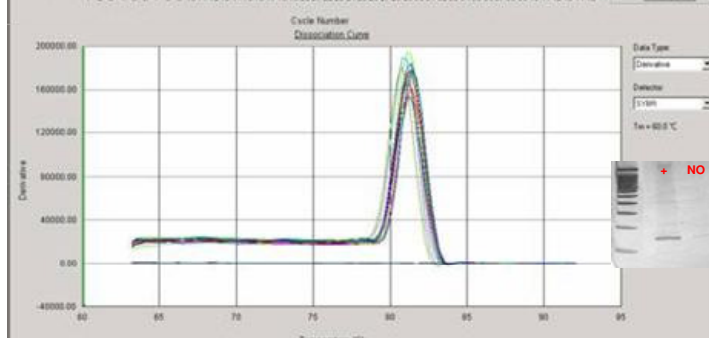
A eficiência de amplificação dos *primers* foi determinada com base na equação $E = 10^{(-1/slope)}$ (Pfaffl, 2001), em que o *slope* corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a relação entre o logarítmo da concentração das amostras pelo CT de cada ponto da curva padrão. As quantidades de cDNA utilizadas para o cálculo de eficiência foram 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng e 0,001 ng de cDNA da linhagem celular SCC-9. Na figura 42 podemos visualizar um

gráfico referente aos CTs das triplicatas de diferentes diluições do cDNA molde de SCC-9 para o gene FAS (Figura 42 A). A figura 42 B representa à curva de dissociação gerada para o fragmento correspondente ao gene FAS e o gel de poliacrilamida realizado para analisar a especificidade do fragmento amplificado. Na figura 42 C pode ser visualizado o gráfico gerado para o cálculo da eficiência de amplificação.

A.



B.



C.

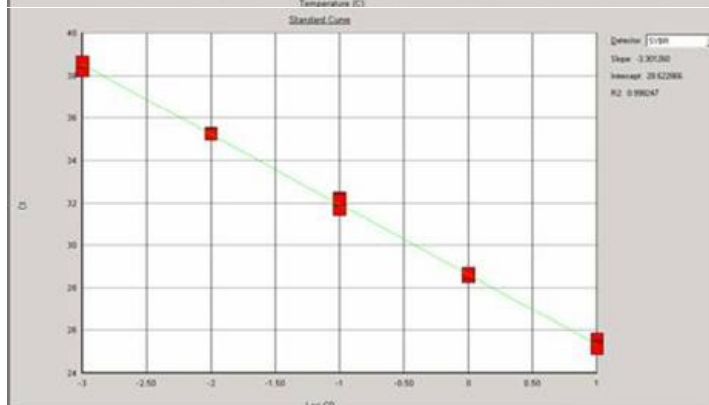


Figura 42. (A) Relação entre os CTs das triplicatas de diferentes diluições do cDNA molde de SCC-9 para o gene FAS e *threshold* estabelecido. (B) A especificidade da reação de amplificação, após a etapa de padronização, foi avaliada por meio do perfil da curva de dissociação do fragmento amplificado e da eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (+: controle positivo e NO: controle negativo). (C) A eficiência da reação de amplificação foi calculada utilizando diluições seriadas do cDNA molde de SCC-9. Após a reação, o programa do aparelho constrói uma reta na qual o valor do CT foi analisado em função do logaritmo da diluição. A inclinação da reta foi utilizada para calcular a eficiência de amplificação segundo a fórmula $E = 10^{(-1/slope)}$, em que o *slope* corresponde à inclinação da reta.

Os *primers* utilizados não tiveram o mesmo desempenho durante as reações de qRT-PCR, logo, as reações não apresentaram a mesma eficiência de amplificação, porém, estavam dentro do intervalo de confiança acima de 95%: ACTB - $R^2 = 99,15\%$, GAPDH - $R^2 = 99,79\%$, HPRT1 - $R^2 = 99,66\%$, BCRP - $R^2 = 99,76\%$ AR - $R^2 = 95,07\%$, FAS - $R^2 = 99,82\%$, ErbB2 - $R^2 = 99,66\%$ e USP2a - $R^2 = 99,47\%$ (Tabela 7). As equações da curva de regressão para os diferentes ensaios foram: ACTB: $y = -3,39095x + 15,43836$; GAPDH: $y = -3,34657x + 17,27288$; HPRT1: $y = -3,33335x + 21,35322$; BCRP: $y = -3,33954x + 25,33656$; AR: $y = -2,91327x + 39,57333$; FAS: $y = -3,30126x + 28,62287$; ErbB2 $y = -3,40635x + 24,17727$ e USP2a: $y = -3,37203x + 20,16708$ (Tabela 7). A eficiência de amplificação foi calculada usando o *slope* da curva padrão de cada gene. Todas as eficiências foram próximas de 100%, sendo 97,19 % para ACTB (E = 1,97), 98,98 % para GAPDH (E = 1,99), 99,53% para HPRT1 (E = 1,99), 99,27% para BCRP (E = 1,99), 95,07% para AR (E = 1,95), 100% para FAS (E = 2,0), 96,59% para ERBB2 (E = 1,97) e para 97,95% USP2a (E = 1,98).

A amplificação específica dos fragmentos foi verificada através da aplicação de 5 µl das reações de qRT-PCR em géis de poliacrilamida a 8% (Figura 43).

Tabela 7. Dados da regressão, equação e eficiência para os genes analisados.

Genes	Slope	Intercept	R²	Eficiência
ACTB	-3,39095	15,43836	99,15%	0,97198204
GAPDH	-3,34657	17,27288	99,79%	0,98982031
HPRT1	-3,33335	21,35322	99,66%	0,99525584
BCRP	-3,33954	25,33656	99,76%	0,99270237
AR	-2,91327	39,57333	95,07%	0,95423289
FAS	-3,30126	28,62287	99,82%	1,00869799
ErbB2	-3,40635	24,17727	99,66%	0,96593477
USP2a	-3,37203	20,16708	99,47%	0,97950722

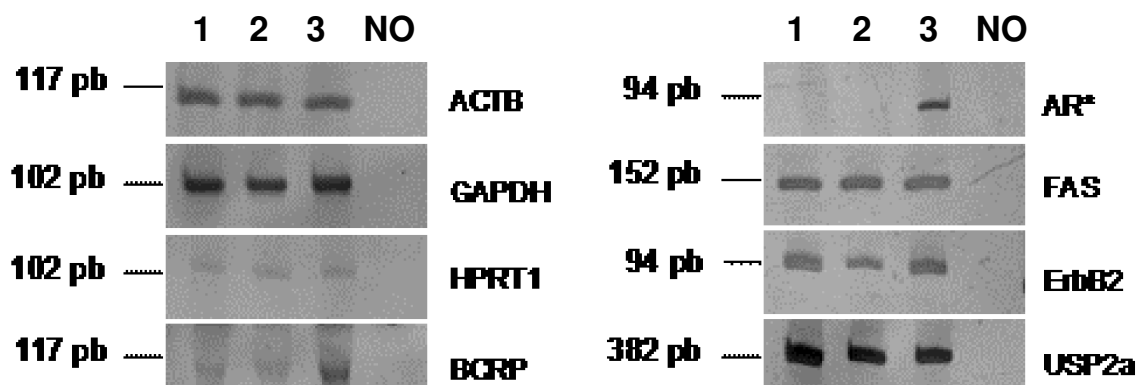


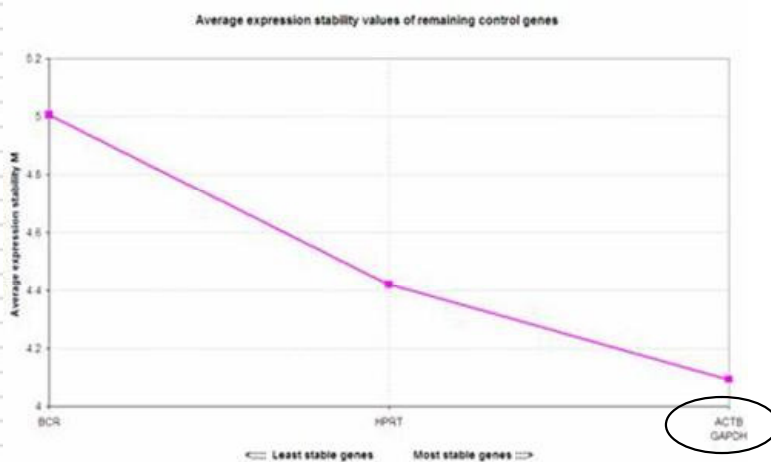
Figura 43. Verificação da amplificação de fragmentos específicos após qRT-PCR. Visualização em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% impregnado com nitrato de prata. As duas primeiras canaletas representam amostras de cDNA microdissecadas a *laser*, a terceira canaleta é a linhagem celular SCC-9, usada como controle positivo da reação e a última canaleta corresponde ao controle negativo da reação (NO). * Nas reações usando o *primer* AR o controle positivo usado foi um cDNA de próstata.

5.11.3. Escolha do normalizador ou gene referência

Dentre os quatro genes normalizadores testados nas amostras deste trabalho, os genes de menor variação, segundo os dados gerados pela ferramenta geNorm (Visual Basic Application - VBA) foram GAPDH e a ACTB. O gene BCRP apresentou maior variabilidade de expressão nas amostras pareadas (Figura 44 A e B).

Além de determinar o gene mais estável, o geNorm calculou a variação sistemática através da análise de variação pareada (V) em que valores de V abaixo de 0,15 indicam que a inclusão de um gene normalizador adicional não é necessário. Neste cálculo o valor de $V_{2/3}$ correspondeu a 0,001 ($V_{2/3} < 0,15$), indicando que não haveria diferença real na utilização de dois ou três genes normalizadores. Desta forma, os dados de expressão diferencial de qRT-PCR para cada transcrito de interesse foi realizada individualmente relativa aos dois genes apontados pelo programa como mais estáveis (ACTB e GAPDH)

geNorm				
Change Data	ACTB	GAPDH	BCR	HPRT
30t	9.84E-08	7.26E-09	9.80E-09	1.01E-08
32n	7.02E-11	7.53E-11	7.52E-10	5.83E-11
32t	5.98E-09	7.43E-10	2.70E-09	9.46E-10
44n	4.48E-09	1.88E-10	1.23E-13	1.62E-10
44t	7.82E-09	1.98E-10	3.80E-10	1.59E-10
bt 2n	7.20E-08	6.73E-10	8.65E-10	4.16E-09
bt 2t	3.16E-06	1.45E-09	3.55E-09	2.52E-08
bt 4n	6.71E-09	4.23E-10	6.24E-11	5.71E-08
bt 4t	3.22E-09	6.41E-10	1.77E-10	3.01E-08
bt 5n	4.60E-09	7.75E-10	8.93E-11	8.93E-11
bt 5t	1.45E-08	1.34E-09	5.38E-10	1.94E-09
bt 8n	5.65E-10	2.50E-10	2.81E-12	3.55E-09
bt 8t	1.16E-09	2.59E-10	2.23E-10	3.04E-09
bt 15n	5.18E-08	1.00E-08	5.70E-10	1.46E-09
bt 15t	1.21E-07	1.75E-10	7.96E-10	1.55E-09
bt 19n	1.84E-09	3.29E-10	2.57E-11	3.22E-11
bt 19t	1.56E-08	2.22E-11	3.19E-11	8.47E-11
bt 21n	8.36E-12	8.79E-11	2.28E-15	1.50E-12
bt 21t	1.00E-11	9.22E-12	6.97E-15	5.83E-12
bt 24n	1.69E-11	5.09E-12	2.50E-11	6.54E-11
bt 24t	6.98E-12	1.22E-09	7.36E-10	2.18E-13
bt 25n	2.03E-11	1.87E-10	8.92E-12	2.21E-10
bt 25t	2.27E-10	2.70E-10	8.05E-10	7.50E-09
bt 26n	1.95E-08	9.25E-11	3.93E-11	1.88E-10
bt 26t	1.55E-09	3.09E-11	1.56E-14	5.32E-11
bt 28n	1.17E-09	3.45E-10	1.93E-09	6.12E-15
bt 28t	3.28E-08	2.67E-09	1.74E-10	1.11E-09
bt 29n	1.31E-08	1.92E-10	6.47E-10	1.05E-09
bt 29t	3.95E-08	1.53E-10	1.22E-09	6.17E-10
bt 31n	1.86E-08	3.61E-09	4.16E-09	5.36E-08
bt 31t	5.03E-11	7.85E-10	3.93E-14	3.24E-10
36153n	1.23E-08	1.74E-10	1.04E-08	4.15E-09
36153t	4.04E-10	2.33E-11	4.99E-10	9.20E-10
	4.622	4.846	5.585	4.960



A

B

Figura 44. Análise dos normalizadores na ferramenta geNorm, para a identificação dos genes mais estáveis para as amostras deste estudo. (A) Os valores da tabela correspondem à eficiência de cada gene normalizador elevada ao ΔCT de cada amostra do normalizador avaliado. O número ressaltado em verde corresponde ao gene normalizador mais estável, e o número ressaltado em vermelho representa o gene normalizador menos estável. (B) Gráfico da estabilidade de expressão dos genes ACTB, GAPDH, BCRP e HPRT1. Os genes localizados a esquerda do gráfico apresentam menor estabilidade comparado com os genes que se localizam a direita do gráfico. Portanto, o gene BCRP é o menos estável e os genes ACT e GAPDH são os mais estáveis nesta comparação.

5.11.4. Expressão dos RNAs mensageiros de FAS, ErbB2 e USP2a em amostras pareadas de CECs e tecido epitelial oral morfológicamente normal por qRT-PCR

Os dados de qRT-PCR das correlações apresentadas foram obtidos da expressão diferencial entre amostras de CEC bucal e amostras pareadas morfológicamente normais relativo ao GAPDH como gene normalizador, uma vez que, as correlações feitas com o ACTB foram praticamente idênticas.

Com base nos dados obtidos pode ser verificado que os transcritos de FAS, ErbB2 e USP2a, avaliados por qRT-PCR, apresentaram uma maior expressão nas amostras tumorais em relação às amostras pareadas morfológicamente normais com média de expressão de 80,3 vezes, 68,5 vezes e 24,5 vezes respectivamente. Foram considerados diferencialmente expressos apenas os transcritos que apresentaram um nível de expressão superior a 5 vezes. Níveis de expressão abaixo deste *cut off* não foram considerados significativos, e por esta razão o gene AR foi excluído das correlações de frequência.

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a expressão gênica de FAS, ErbB2 e USP2a com a sobrevida global e sobrevida livre de doença dos pacientes que compuseram esta amostra (Tabela 8). O estudo estatístico de nossos resultados revelou que as amostras que apresentaram níveis de expressão gênica para FAS superior a 80,3 vezes estavam correlacionadas com pacientes classificados como N+, ou seja, no momento do diagnóstico apresentavam metástases linfonodais ($p=0,002$) (Tabela 9). A mesma correlação com os linfonodos positivos foi detectada nos pacientes que apresentaram expressão gênica maior que 68,5 vezes para ErbB2 ($p=0,006$) e maior que 24,5 vezes para USP2a ($p=0,001$) (Tabela 9). Em relação ao estadiamento clínico T, os casos diagnosticados tardiamente foram associados positivamente a maior expressão gênica de ErbB2 ($p=0,001$) (Tabela 9). ErbB2 também foi associado aos casos que apresentaram microscopicamente invasão perineural ($p=0,046$) (Tabela 9).

Uma observação importante foi o fato de uma grande porcentagem dos pacientes com alta expressão gênica para FAS estarem também acima da média de expressão para os genes ErbB2 e USP2a, com correlação positiva estatisticamente significativa ($p=0,001$ e $p=0,001$, respectivamente). Da mesma forma, os resultados revelaram uma associação significativa entre a maior expressão gênica de ErbB2 nos casos que estavam acima da média de expressão para o gene USP2a ($p=0,001$). Assim, a expressão gênica de FAS, ErbB2 e USP2a estão estatisticamente correlacionadas nas amostras deste estudo. Outro achado interessante foi que a maior expressão gênica de FAS, ErbB2 e USP2a foi associada aos pacientes fumantes ($p=0,019$, $p=0,036$ e $p=0,036$ respectivamente) (Tabela 9).

Tabela 8: Análise da sobrevida global e da sobrevida livre de doença de acordo com os dados de expressão gênica de FAS, ErbB2 e USP2a.

Dados de expressão gênica			Sobrevida global acumulada (%)				p
			1 ano	3 anos	4 anos	5 anos	
FAS	$\leq 80,3$		80	67,69	58,67	44	0,3678
	$> 80,3$		71,43	49,56	49,56	49,56	
ErbB2	$\leq 68,5$		68,42	61,58	51,32	30,79	0,6637
	$> 68,5$		81,82	56,35	56,35	56,35	
USP2a	$\leq 24,5$		80	73,85	65,54	51,05	0,1546
	$> 24,5$		71,43	43,98	43,98	43,98	
			Sobrevida livre de doença acumulada (%)				p
FAS	$\leq 80,3$		69,23	58,15	58,15	58,15	0,2300
	$> 80,3$		57,14	47,20	47,20	28,32	
ErbB2	$\leq 68,5$		67,57	61,43	61,43	61,43	0,2863
	$> 68,5$		59,09	45,45	45,45	45,45	
USP2a	$\leq 24,5$		60,98	55,43	55,43	55,43	0,5678
	$> 24,5$		65	50	50	30	

Tabela 9: Correlação entre dados de expressão gênica de FAS, ErbB2 e USP2a com as variáveis clinicopatológicas.

Variáveis clinicopatológicas		FAS n (%)		ErbB2 n (%)		USP2a n (%)	
		≤ 80,3	> 80,3	≤ 68,5	> 68,5	≤ 24,5	> 24,5
Idade	≤ 59,2 anos	9 (50)	13 (56,52)	10 (50)	12 (57,14)	11 (55)	11 (52,38)
	> 59,2 anos	9 (50)	10 (43,48)	10 (50)	9 (42,86)	9 (45)	10 (47,62)
Gênero	Masculino	14 (77,78)	21 (91,3)	16 (80)	19 (90,48)	15 (75)	20 (95,24)
	Feminino	4 (22,22)	2 (8,7)	4 (20)	2 (9,52)	5 (25)	1 (4,76)
Raça	Branca	16 (88,89)	20 (86,96)	17 (85)	19 (90,48)	18 (90)	18 (85,71)
	Não Branca	2 (11,11)	3 (13,04)	3 (15)	2 (9,52)	2 (10)	3 (14,29)
Hábito de fumar	Não	7 (43,75)	2 (8,7)*	7 (38,89)	2 (9,52)*	7 (38,89)	2 (9,52)*
	Sim	9 (56,25)	21 (91,3)	11 (61,11)	19 (90,48)	11 (61,11)	19 (90,48)
Consumo de álcool	Não	5 (33,33)	4 (17,39)	6 (35,29)	3 (14,29)	5 (29,41)	4 (19,05)
	Sim	10 (66,67)	19 (82,61)	11 (64,71)	18 (85,71)	12 (70,59)	17 (80,95)
Extensão outros locais	Não	5 (35,71)	5 (31,25)	7 (43,75)	3 (21,43)	6 (37,5)	4 (28,57)
	Sim	9 (64,29)	11 (68,75)	9 (56,25)	11 (78,57)	10 (62,5)	10 (71,43)
Estadiamento T	T1+T2	10 (55,56)	11 (50)	17 (85,71)	4 (20)♣	9 (45)	12 (60)
	T3+T4	8 (44,44)	11 (50)	3 (14,29)	16 (80)	11 (55)	8 (40)
Linfonodos	N0	13 (76,47)	5 (25)♣	15 (75)	3 (17,65)♣	13 (72,22)	5 (26,32)♣
	N+	4 (23,53)	15 (75)	5 (25)	14 (82,35)	5 (27,78)	14 (73,68)
Grau histológico	I	5 (27,78)	11 (47,83)	6 (30)	10 (47,62)	9 (45)	7 (33,33)
	II	10 (55,56)	11 (47,83)	12 (60)	9 (42,86)	10 (50)	11 (52,38)
	III	3 (16,66)	1 (4,34)	2 (10)	2 (9,52)	1 (5)	3 (14,29)
Invasão vascular	Não	16 (94,12)	20 (86,96)	17 (89,47)	19 (90,48)	18 (94,74)	18 (85,71)
	Sim	1 (5,88)	3 (13,04)	2 (10,53)	2 (9,52)	1 (5,26)	3 (14,29)
Invasão linfática	Não	11 (64,71)	18 (78,26)	14 (73,68)	15 (71,43)	15 (78,95)	14 (66,67)
	Sim	6 (35,29)	5 (21,74)	5 (26,32)	6 (28,57)	4 (21,05)	7 (33,33)
Invasão perineural	Não	7 (41,18)	11 (47,83)	6 (31,58)	12 (57,14)*	9 (47,37)	9 (42,86)
	Sim	10 (58,82)	12 (52,17)	13 (68,42)	9 (42,86)	10 (52,63)	12 (57,14)
Espessura da lesão	≤ 29,0 mm	8 (50)	10 (45,45)	8 (47,06)	10 (47,62)	6 (35,29)	12 (57,14)
	> 29,0 mm	8 (50)	12 (54,55)	9 (52,94)	11 (52,38)	11 (64,71)	9 (42,86)
Comprometimento dos linfonodos	Não	9 (75)	6 (42,86)	8 (61,54)	7 (53,85)	9 (60)	6 (54,55)
	Sim	3 (25)	8 (57,14)	5 (38,46)	6 (46,15)	6 (40)	5 (45,45)

*p<0,05; ♣p<0,01

0 + 1: Marcação negativa +positiva fraca; 2: Marcação positiva forte

6. DISCUSSÃO

ErbB2 é um receptor com atividade de tirosina-quinase envolvido na etiologia de neoplasias malignas humanas, cujo aumento de expressão tem sido positivamente associado a um fenótipo mais agressivo e pior prognóstico (Eccles, 2001; Menard *et al.*, 2001; Pritchard *et al.*, 2006). A conexão molecular entre a proteína ErbB2 e a enzima FAS foi evidenciada pelo aumento de expressão do gene que codifica FAS em uma linhagem celular derivada de glândula mamária (H16N2), após a expressão forçada e estável de grandes quantidades de ErbB2 (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Posteriormente, foi também demonstrado que a super-expressão de ErbB2 em fibroblastos de camundongos estimula a expressão da proteína FAS através das vias PI3K e MAPK (Menendez *et al.*, 2004a; Menendez *et al.*, 2005a). Menendez *et al.* (2004b) comprovaram que a inibição de FAS, através de inibidores farmacológicos ou por RNA de interferência, regula negativamente a expressão de ErbB2 em linhagens celulares de mama e ovário. No nosso trabalho de mestrado encontramos uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão de ErbB2 e de FAS em CECs de cabeça e pescoço, através de reações imunohistoquímicas (Silva *et al.*, 2004).

A biossíntese endógena de ácidos graxos desempenha papel fundamental na manutenção das atividades celulares, ocorrendo no citoplasma de forma dependente de FAS, cuja expressão e atividade estão elevadas em diversos tipos de neoplasias malignas humanas (Krontiras *et al.*, 1999; Vlad *et al.*, 1999; Oskouian, 2000; Piyathilake *et al.*, 2000; Dhanasekaran *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002; Swinnen *et al.*, 2002; Innocenzi *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2003; Visca *et al.*, 2003; Baron *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Agostini *et al.*, 2004). Em alguns destes tumores, a alta produção de FAS está positivamente correlacionada com comportamento mais agressivo e pior prognóstico, como observado em carcinomas de mama, próstata, ovário, endométrio, bexiga, pulmão, colo, melanomas e sarcomas de partes moles (Alo *et al.*, 1996; Shurbaji *et al.*, 1996; Gansler *et al.*, 1997; Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000; Visca *et al.*, 2003;

Takahiro *et al.*, 2003; Innocenzi *et al.*, 2003; Visca *et al.*, 2004; Sebastiani *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2006).

A expressão diferencial de FAS entre células normais e tumorais a torna um alvo terapêutico em potencial (Kuhajda *et al.*, 2000). Trabalhos experimentais têm demonstrado que FAS é essencial para a sobrevivência celular, pois inibidores farmacológicos específicos da sua atividade, como cerulenina, C75 e Orlistat têm efeito seletivo sobre a proliferação de células tumorais em cultura (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998b; Kuhajda, 2000; Li *et al.*, 2001; Menendez *et al.*, 2005a). Uma síntese adicional de ácidos graxos parece ser requerida para a produção das membranas nas células tumorais em rápida divisão mitótica durante as fases G₁ e S, pois os ácidos graxos de cadeias longas produzidos a partir de estereato e palmitato (gerados pela FAS) são necessários para a divisão celular (Jackowski *et al.*, 2000; Hannun & Obeid, 2002). Os inibidores de FAS são capazes de impedir a proliferação celular através do bloqueio da síntese de DNA e conseqüentemente da fase S do ciclo celular, o que leva as células à morte por apoptose (Kuhajda *et al.*, 1994; Pizer *et al.*, 1996b; Pizer *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2005a). Este fato sugere que o metabolismo dos lipídios é essencial para a progressão do ciclo celular. O tratamento de células tumorais *in vitro* com cerulenina, um inibidor covalente que inativa o domínio β -cetoacil sintase de FAS, causa apoptose, demonstrando que as células tumorais requerem esta via funcional (Pizer *et al.*, 1996a). No entanto, cerulenina tem limitada atividade *in vivo*, durante inibição de câncer de ovário humano em modelos xenográficos (Pizer *et al.*, 1996a). O tratamento *in vitro* com C75, em células do câncer de mama, leva a rápida inibição da síntese de ácidos graxos seguida pela inibição de replicação do DNA, o que culmina com a morte celular programada (Pizer *et al.*, 1998b). Aparentemente, o acúmulo do intermediário metabólico malonil-CoA, resultante do tratamento com C75, causa apoptose nos experimentos em cultura de células tumorais (Swinnen *et al.*, 2000; Pizer *et al.*, 2000). Orlistat, uma droga usada clinicamente para provocar perda de peso, tem propriedades seletivas anti-tumorais em células de câncer na próstata e mama

devido à sua capacidade de bloquear a atividade lipogênica de FAS, induzindo um potente efeito anti-proliferativo e apoptótico (Menendez *et al.*, 2005c; Menendez *et al.*, 2005d). Em conjunto, estes achados reforçam que a atividade de FAS pode ser um alvo para o desenvolvimento de novas drogas em oncologia. Entretanto, são necessários mais estudos para avaliar com cautela se as drogas já existentes possuem outros alvos moleculares e detectar seus efeitos colaterais, assim como buscar antagonistas de FAS com melhor seletividade.

De acordo com nossos trabalhos prévios (Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007a, Silva *et al.*, 2007b - dados aceitos para publicação - Anexos 6 e 7) e com os achados de Krontiras *et al.* (1999), os resultados do presente estudo confirmam que a produção de FAS é maior no CEC bucal do que no epitélio morfológicamente normal adjacente. Em contraste com outras malignidades, a maior positividade imunohistoquímica de FAS ocorre nos CECs bem diferenciados (Silva *et al.*, 2004; Krontiras *et al.*, 1999). Experimentos realizados em nosso laboratório demonstraram que a expressão de FAS é estimulada durante a diferenciação dos queratinócitos orais (Silva SD *et al.*, em preparação – Anexo 8), pois as áreas de queratinização dos CECs bem-diferenciados são mais positivas para FAS do que as regiões pobremente diferenciadas. Nas amostras do presente trabalho, a expressão gênica do RNA mensageiro de FAS foi 80,3 vezes maior nos CECs do que no epitélio morfológicamente normal adjacente. Além do mais, o fato da positividade imunohistoquímica para FAS estar associada com características microscópicas como infiltração linfática ($p=0,035$), espessura maior que 29,0 mm ($p=0,006$), comprometimento dos linfonodos ($p=0,039$) e com o menor tempo de sobrevida global e livre de doença sugere que a expressão de FAS seja importante para a progressão tumoral.

Neste estudo nós confirmamos também observações prévias de que ErbB2 está preferencialmente expresso na membrana celular das células do epitélio morfológicamente normal e dos CECs bem diferenciados (Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007b - Anexo 7). A positividade citoplasmática para ErbB2 também foi observada em nossos casos e está provavelmente relacionada com alterações no

processo de internalização do receptor, sua degradação proteolítica, ou mesmo acúmulo de moléculas recém sintetizadas. De fato, este padrão de positividade de ErbB2 tem sido descrito em carcinomas colo-retais, de pâncreas e de pulmão (Half *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005) e está claramente associado aos CECs com estadiamento avançado de língua (Silva *et al.*, 2007b, - Anexo 7). Nos nossos casos de CECs bem diferenciados, ErbB2 estava presente na membrana celular nas áreas próximas as pérolas de queratina, enquanto que nos CECs pobremente diferenciados, ErbB2 esteve expresso somente no citoplasma. A positividade para ErbB2 na membrana celular foi inversamente correlacionada com a coloração no citoplasma, que foi por sua vez correlacionada com proliferação celular, pela avaliação da marcação para o antígeno Ki-67.

Estes achados podem ter implicações clínicas desde que a avaliação qualitativa da expressão de ErbB2 (membrana e/ou citoplasma), juntamente com o índice de proliferação obtido pela marcação para Ki-67 poderia ser usado para selecionar protocolos de tratamento ou predizer o curso clínico da doença. Nossos resultados também demonstram correlação entre ErbB2 na superfície celular e positividade de FAS ($p=0,001$). Uma conexão bi-direcional entre a expressão deste receptor e FAS foi experimentalmente verificada por Menendez *et al.* (2004a). De acordo com estes autores, a inibição da expressão de FAS por RNAi ou por cerulenina regulou negativamente os níveis de RNAs mensageiros para ErbB2 em linhagens celulares de câncer de ovário e mama (Menendez *et al.* 2004a; Menendez *et al.* 2004b). Entretanto, a associação de cerulenina e Trastuzumab (Herceptin) aumentou de forma sinérgica a morte celular em linhagem celular de mama (Menendez *et al.* 2005a). Além do mais, células NIH-3T3 que super-expressam ErbB2 têm altos níveis da proteína FAS, o crescimento em agar inibido pela cerulenina e a taxa de apoptose aumentada, em comparação com células selvagens (Furuya *et al.*, 1997). Os resultados do presente trabalho sugerem que a co-expressão de FAS e ErbB2 em membrana celular indica que a participação desta enzima está ligada aos processos de queratinização (Silva SD *et al.* - Anexo 8).

No entanto, nem sempre as quantidades de RNAs mensageiros e da proteína FAS são correspondentes, o que sugere um mecanismo de regulação pós-traducional (Rossi *et al.*, 2003). Vários estudos têm demonstrado que alterações nas reações de ubiquitinação e desubiquitinação estão diretamente envolvidas na etiologia de algumas malignidades (Hershko & Ciechanover, 1998; Ciechanover *et al.*, 2000; Ciechanover & Schwartz 2004). Segundo alguns destes autores, tumores malignos podem ser o resultado da estabilização de oncoproteínas e fatores que promovam o crescimento ou da desestabilização de proteínas supressoras de tumor (Ciechanover & Schwartz 2004). O processo de ubiquitinação de substratos marcados para degradação é reversível. As DUBs catalisam a remoção de Ub de substratos protéicos desta forma marcados para a degradação. Assim, a retirada de cadeias de poli-Ub pelas DUBs prolongaria a meia-vida de seus substratos, protegendo-os da degradação proteassômica. Graner *et al.* (2004) demonstraram que a DUB USP2a desempenha importante função na sobrevivência das células do câncer de próstata através da estabilização de FAS. Estes autores sugeriram que a USP2a tem ação pré-proteassomal capaz de clivar cadeias poli-Ub de FAS, protegendo-a da degradação proteassômica e consequentemente aumentando a meia-vida intracelular desta enzima metabólica. No presente estudo, nós encontramos uma correlação estatisticamente significativa entre os RNAs mensageiros de USP2a, de FAS e do oncogene ErbB2 ($p=0,001$) e mostramos que a expressão destes três genes é maior nos CECs bucais do que no epitélio morfológicamente normal (24,5 vezes, 80,3 vezes e 68,5 vezes, respectivamente).

Uma dificuldade no uso de amostras tumorais humanas em estudos de expressão gênica é a heterogeneidade celular que compõe a lesão, tanto das próprias células tumorais como do estroma, composto por diferentes tipos celulares. Utilizando a tecnologia de microdissecção a laser (*Laser Capture Microdissection* – LCM) a fim de selecionar somente as células de interesse para o estudo, nos deparamos com um problema: o pequeno tamanho das amostras congeladas no Banco de Tumores e as quantidades reduzidas de RNA total delas

extraídas. Isto torna a realização de experimentos que necessitam da utilização de triplicatas muitas vezes impraticável, a menos que se introduza o passo de amplificação do RNA mensageiro.

A amplificação do RNA por transcrição *in vitro* é uma metodologia que está sendo difundida na literatura, por permitir a amplificação linear de pequenas quantidades (picogramas) de RNA total. Isto se torna muito interessante, uma vez que os clínicos buscam métodos cada vez menos invasivos para diagnóstico e tratamento, que são feitos em estágios cada vez mais precoces da doença. Como consequência, as fontes de material são sempre menores resultando em quantidades reduzidas de RNA total para pesquisa.

Várias metodologias de amplificação do RNA mensageiro estão disponíveis na literatura (Van Gelder *et al.*, 1990, Eberwine, *et al.*, 1992, Phillips, *et al.*, 1996), as quais se baseiam na produção de cDNA a partir de quantidades pequenas de RNA total (menos que 3µg). Estas técnicas sintetizam a primeira fita de cDNA com oligonucleotídeos que ancoram na cauda poli-A do RNA mensageiro e carregam o promotor da RNA polimerase do fago T7. A segunda fita geralmente é feita pela degradação do RNA mensageiro (poli A) com RNase H, seguida pela sua síntese com as enzimas *E. coli* DNA polimerase e ligase. Outro método bastante utilizado baseia-se na utilização do iniciador *template switching* (TS), que teoricamente aumentaria a geração de cDNAs inteiros (Wang *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2003). O cDNA dupla fita é então submetido a 1 ou 2 ciclos de transcrição *in vitro*, o que permite a produção de RNA anti-sense (aRNA) na ordem de 3×10^2 a 3×10^3 vezes.

Comparações do RNA anti-sense amplificado (aRNA) com RNA total, realizadas em experimentos de *microarray* de cDNA, mostraram que o RNA total pode ser substituído por RNA anti-sense amplificado com aceitável reprodutibilidade e alta fidelidade (Wang *et al.*, 2000, Puskas, *et al.*, 2002. Gomes *et al.*, 2003, Zhu *et al.*, 2005). Entretanto, não existe na literatura nenhum trabalho mostrando se o uso de RNA amplificado interfere ou não no perfil de expressão gênica em experimentos de qRT-PCR. A análise da expressão de um

determinado gene em experimentos de *microarray* é feita comparando-se o mesmo gene em diferentes casos, sem a normalização com um controle endógeno constitutivo, como ocorre nos experimentos de qRT-PCR. A comparação da expressão de diferentes genes em relação a um normalizador pode ser influenciada pela metodologia de amplificação, uma vez que cada amostra pode ter maior ou menor eficiência durante a transcrição *in vitro* de determinadas regiões do gene, podendo gerar super ou sub representação, o que afetaria os resultados de quantificação.

Uma vez que a reação de qRT-PCR é extremamente sensível, passível de sofrer variações e interferências, o desenho experimental e a normalização são imperativos (Wong & Mendrano, 2005). Assim, para garantir que as amostras microdissecadas poderiam ser submetidas à amplificação do RNA sem que fosse introduzindo nenhum artefato ao experimento, comparamos duas amostras tumorais com perfil de expressão gênica semelhante e duas linhagens celulares com grande diferença de expressão gênica, submetidas ou não a técnica de amplificação utilizando T7 RNA polimerase. Em experimentos de quantificação da expressão gênica com utilização de amostras diferentes, deve-se também sempre levar em consideração a existência de erros na quantificação do RNA/cDNA, bem como variações na eficiência da reação de transcrição deste RNA para cDNA. Conseqüentemente, esta questão faz surgir outro importante ponto no aspecto do desenho experimental: a escolha de um gene apropriado cuja expressão não varie ou varie muito pouco, entre as amostras, para ser usado como um gene normalizador. O propósito da normalização é minimizar as variações sistemáticas da medida da expressão gênica de duas amostras de RNA, para que apenas as diferenças biológicas possam ser distinguidas. Por esta razão foram desenhados *primers* para 4 genes comumente considerados pela literatura como sendo de expressão constitutiva ou *housekeeping genes*: GAPDH (NM_002046.2), ACTB (NM_001101.2), HPRT1 (NM_000194) e BCRP (NM_004327). Outro fator que pode interferir nos resultados é a forma de analisar os dados do experimento de qRT-PCR, onde a eficiência de amplificação deve ser individualizada para cada

gene e para cada amostra, uma vez que, em geral, os *primers* apresentam eficiências diferentes, e os cálculos sem um fator apropriado de correção podem superestimar os valores obtidos da mensuração da expressão gênica.

Quando comparamos diretamente o perfil de expressão gênica de amostras com RNA amplificado e não amplificado, observamos diferenças muito grandes e dados discrepantes. Entretanto, quando confrontamos amostras submetidas a mesma metodologia (entre amostras com RNA amplificado e entre amostras sem amplificação do RNA) uma variação aceitável no perfil de expressão gênica foi observada. Tais alterações são ruídos inerentes a metodologia de qRT-PCR e, portanto, o uso de amostras com RNA amplificado nestes experimentos é possível.

Em resumo, nossos resultados demonstram que USP2a, ErbB2 e FAS são simultaneamente expressos nos casos de CEC oral analisados neste trabalho, sendo todos mais abundantes nas amostras tumorais do que no epitélio morfológicamente normal. Além do mais, ErbB2 parece regular a expressão de FAS nestes tumores, assim como USP2a, que pode protegê-la da degradação pelos proteassomos. Finalmente, os pacientes cujos CECs expressaram altos níveis de Ki-67 e tiveram marcação citoplasmática para ErbB2 apresentaram um tempo de sobrevida significativamente menor do que aqueles que mostraram baixa expressão destes antígenos. Serão necessários ainda vários estudos para correlacionar o papel de USP2a na estabilização da proteína FAS no CEC bucal, assim como para verificar a correlação entre RNA mensageiros e seus respectivos produtos protéicos nestas mesmas amostras tumorais.

7. CONCLUSÃO

1. A marcação imunohistoquímica positiva para ErbB2 em membrana citoplasmática e a expressão de FAS ocorre nos tumores que apresentam comprometimento microscópico dos linfonodos e espessura maior do que a média dos tumores desta amostra.
2. Intensa expressão de ErbB2 na membrana celular ocorre em áreas de maior diferenciação celular e positividade citoplasmática nas áreas indiferenciadas e nas lesões com ruptura da cápsula linfonodal.
3. Tumores com grande porcentagem das células positivas para ErbB2 no citoplasma expressam maior quantidade do antígeno de proliferação celular Ki-67.
4. Não foi observada expressão da proteína RA não nos casos de CEC bucal que compuseram esta amostra.
5. Os transcritos USP2a, FAS e ErbB2 estão diferencialmente expressos entre as amostras tumorais de CEC bucal, em relação ao tecido morfológicamente normal das margens das lesões.
6. Há correlação estatística entre a expressão gênica de FAS, ErbB2 e USP2a, a qual está associada com pacientes fumantes e presença de metástases linfonodais no momento do diagnóstico.
7. Pacientes com maior expressão gênica para ErbB2 têm estadiamento clínico mais avançado e invasão perineural.
8. As proteínas analisadas mostraram ser marcadores moleculares para o prognóstico, sendo a alta expressão de FAS, ErbB2 e Ki-67 relacionadas com o menor tempo de sobrevida global e livre de doença nestes tumores.

REFERÊNCIAS*

- Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, Graner E. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol.* 2004; 40 (7): 728-35.
- Albanell J, Bellmunt J, Molina R, Garcia M, Caragol I, Bermejo B, Ribas A, Carulla J, Gallego OS, Espanol T, Sole Calvo LA. Node-negative breast cancers with p53 (-)/HER2-neu (-) status may identify women with very good prognosis. *Anticancer Res.* 1996; 16 (2): 1027-32.
- Almeida JP, Coletta RD, Silva SD, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L, Graner E. Proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol.* 2005; 76 (2): 272-8.
- Albuquerque RL Jr, Miguel MC, Costa AL, Souza LB. Correlation of c-erbB-2 and S-100 expression with the malignancy grading and anatomical site in oral squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol.* 2003; 84 (6): 259-65.
- Alo PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V, Serpieri DE, Di Tondo U. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep.* 2000; 7 (6): 1383-8.
- Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer.* 1996; 77 (3): 474-82.
- Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P. Role of alcohol and tobacco in the etiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995; 31 (5): 301-9.
- Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res.* 1987; 95 (3): 229-49.
- Arcturus microdissection system. Disponível em URL: <http://www.arctur.com> (2006 Nov 2).
- Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem.* 2004; 91 (1): 47-53.

* De acordo com a Norma da Unicamp, baseado no modelo Vancouver.
Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1996; 14 (3): 737-44.

Bei R, Pompa G, Vitolo D, Moriconi E, Ciocchi L, Quaranta M, Frati L, Kraus MH, Muraro R. Co-localization of multiple ErbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 2001; 195 (3): 343-8.

Brink J, Ludtke SJ, Yang CY, Gu ZW, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99 (1): 138-43.

Brown MS; Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cell and blood. *Proc. Natl. Aca. Sci. U S A*. 1999; 96 (20): 11041-8.

Brown MS; Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997; 89 (3): 331-40.

Brusselmans K, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 2003; 106 (6): 856-62.

Bull JH, Ellison G, Patel A, Muir G, Walker M, Underwood M, Khan F, Paskins L. Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. *Br J Cancer*. 2001; 84 (11): 1512-9.

Burger AM, Seth AK. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications *Eur J Cancer*. 2004; 40 (15): 2217-29.

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996; 56 (11): 2488-92

Casalini P, Iorio MV, Galmozzi E, Menard S. Role of HER receptors family in development and differentiation. *J Cell Physiol*. 2004; 200 (3): 343-50.

Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, Finegold M, Wakil S. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100 (11): 6358-63.

Chirala SS, Huang WY, Jayakumar A, Sakai K, Wakil SJ. Animal fatty acid synthase: functional mapping and cloning and expression of the domain I constituent activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94 (11): 5588-93.

Chirala SS, Jayakumar A, Gu ZW, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98 (6): 3104-8.

Cheng CM, Tsuneyama K, Matsui K, Takahashi H, Ishizawa S, Takano Y. Cytoplasmic expression of c-erbB2 in non-small cell lung cancers. *Virchows Arch*. 2005; 446 (6): 596-603.

Chung CH, Baek SH. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 266: 633-40.

Chung CH, Levy S, Yarbrough WG. Clinical applications of genomics in head and neck cancer. *Head Neck*. 2006; 28 (4): 360-8.

Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem*. 2000; 34: 40-51.

Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1695 (1-3): 3-17.

Clegg DJ, Wortman MD, Benoit SC, McOsker CC, Seeley RJ. Comparison of central and peripheral administration of C75 on food intake, body weight, and conditioned taste aversion. *Diabetes*. 2002; 51 (11): 3196-201.

Coletta RD, Graner E, Lopes MA, Vargas PA, Jorge JJ, Almeida OP. Os avanços da biologia molecular e o câncer bucal. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent*. 2002; 56 (1): 62-7.

Cummins JM, Vogelstein B. HAUSP is required for p53 destabilization. *Cell Cycle*. 2004; 3 (6): 689-92.

DeSalle LM, Latres E, Lin D, Graner E, Montagnoli A, Baker RT, Pagano M, Loda M. The de-ubiquitinating enzyme Unp interacts with the retinoblastoma protein. *Oncogene*. 2001; 20 (39): 5538-42.

De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2003; 63 (13): 3799-04.

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature.* 2001; 412 (6849): 822-6.

Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, Cao Y, Nair S, Finnell R, Zettel M, Coleman P. Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89 (7): 3010-4.

Eccles SA. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001; 6 (4): 393-406.

Eissa S, Ali HS, Al Tonsi AH, Zaglol A, El Ahmady O. HER2/neu expression in bladder cancer: relationship to cell cycle kinetics. *Clin Biochem* 2005; 38 (2): 142-8.

Epstein JI, Carmichael M, Partin AW. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic state in adenocarcinoma of the prostate. *Urology.* 1995; 45 (1): 81-6.

Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, Fava AS, Torloni H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer.* 1989; 43 (6): 992-1000.

Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H. Apoptosis in androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res.* 1997; 17 (6D): 4589-93.

Gansler TS, Hardman W 3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol.* 1997; 28 (6): 686-92.

Gomes LI, Silva RL, Stolf BS, Cristo EB, Hirata R, Soares FA, Reis LF, Neves EJ, Carvalho AF. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. *Anal Biochem.* 2003; 321 (2): 244-51.

Gousseva N, Baker RT. Gene structure, alternate splicing, tissue distribution, cellular localization, and developmental expression pattern of mouse deubiquitinating enzyme isoforms Usp2-45 and Usp2-69. *Gene Exp.* 2003; 11 (3-4): 163-79.

Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ, Lechpammer M, Huesken D, Zimmermann J, Signoretti S, Loda M. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*. 2004; 5 (3): 253-61.

Guo CB, Cui NB, Yu GY, Liu DX, Meng SC, Song Q. Effects of cerulenin on the endogenous fatty acid synthetic activity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61 (8): 909-12.

Half E, Broaddus R, Danenberg KD, Danenberg PV, Ayers GD, Sinicrope FA. HER-2 receptor expression, localization, and activation in colorectal cancer cell lines and human tumors. *Int J Cancer*. 2004; 108 (4): 540-8.

Hannun YA, Obeid LM. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem*. 2002; 277 (29): 25847-50.

Heemers H, Maes B, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol Endocrinol*. 2001; 15 (10): 1817-28.

Heemers H, Vanderhoydonc F, Roskams T, Shechter WH, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgens stimulate coordinated lipogenic gene expression in normal target tissues in vivo. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2003; 205 (10): 21-31.

Heiligtag SJ, Bredehorst R, David KA. Key role of mitochondria in cerulenin-mediated apoptosis. *Cell Death Differ*. 2002; 9 (9): 1017-25.

Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67: 425-79.

Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*. 2003; 284 (1): 99-110.

Hortobagyi GN. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353 (16): 1734-6.

Hou L, Shi D, Tu SM, Zhang HZ, Hung MC, Ling D. Oral cancer progression and cerbB-2/neu proto-oncogene expression. *Cancer Lett*. 1992; 65 (3): 215-20.

Hsu MH, Chirala SS, Wakil SJ. Human fatty-acid synthase gene. Evidence for the presence of two promoters and their functional interaction. *J Biol Chem*. 1996; 271 (23): 13584-92.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5 (5): 341-54.

Ibrahim SO, Vasstrand EN, Liavaag PG, Johannessen AC, Lillehaug JR. Expression of c-erbB proto-oncogene family members in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*. 1997; 17 (6D): 4539-46.

Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G, Ricciardi G, Bosman C, Calvieri S. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol USA*. 2003; 30 (1): 23-8.

Isola J, Chu L, DeVries S, Matsumura K, Chew K, Ljung BM, Waldman FM. Genetic alterations in ERBB2-amplified breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 1999; 5 (12): 4140-5.

Jackowski S, Wang J, Baburina I. Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1483 (3): 301-15.

Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, Chirala SS, Wakil SJ. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci*. 1995; 92 (19): 8695-9.

Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Epidemiology and etiology of oral cancer in the United Kingdom. *Community Dent Health*. 1993; 10 Suppl 1: 13-29.

Karunakaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J*. 1996; 15 (2): 254-64.

Khademi B, Shirazi FM, Vasei M, Doroudchi M, Gandomi B, Modjtahedi H, Pezeshki AM, Ghaderi A. The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Lett*. 2002; 184 (2): 223-30.

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

- Khan AN, Yang W, Seifalian AM, Winslet MC. HER2 (ErbB2) receptors, a potential therapeutic target in squamous cell carcinoma of oesophagus. *Br J Cancer*. 2006; 94 (8): 1213-5.
- Kim JH, Park KC, Chung SS, Bang O, Chung CH. Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. *J Biochem*. 2003; 134 (1): 9-18.
- Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D, Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature*. 2003; 424 (6950): 801-5.
- Kowalski LP, Anelli A, Salvajoli JV, Lopes LF. *Manual de Condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia*. São Paulo: Âmbito Editores, 2^a edição; 2003.
- Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res*. 2004; 64 (6): 2070-5.
- Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE, Grizzle WE. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck*. 1999; 21 (4): 325-9.
- Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*. 2000; 16 (3): 202-8.
- Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD, Pasternack GR. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91 (14): 6379-83.
- Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97 (7): 3450-4.
- Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res*. 2003; 63 (1): 132-9.
- Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology*. 2002; 40 (1): 71-9.
- Lacasa D, Le Liepvre X, Ferre P, Dugail I. Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression: potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. *J Biol Chem*. 2001; 276 (15): 11512-6.

Lam YA, Xu W, De Martino GN, Cohen RE. Editing of ubiquitina conjugates by an isopeptidases in the 26S proteosome. *Nature*. 1997; 385: 737-40.

Li JN, Gorospe M, Chrest FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WF, Pizer ES. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res*. 2001; 61 (4): 1493-9.

Li M, Brooks CL, Kon N, Gu W. A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol Cell*. 2004; 13 (6): 879-86.

Line SRP, Lopes MA, Zaia AA, Jorge JJ. As alterações gênicas e o desenvolvimento do câncer bucal. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent*. 1995; 49 (1): 51-6.

Liu E, Thor A, He M, Barcos M, Ljung BM, Benz C. The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in *in situ* carcinomas of the breast. *Oncogene*. 1992; 7 (5): 1027-32.

Livak, KJ, Schmittgen, TD Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT. *Method. Methods*. 2001: 402-8.

Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol*. 2001; 37 (5): 401-18.

Lopes A, Iyeyasu H, Lopes LF, Castro RMRPS, Almeida ES. *Oncologia para graduação*. Ribeirão Preto: Tecmed; 2005.

Lopes MA, Coletta RD, Alves FA, Abbade N, Rossi JA. Reconhecendo e controlando os efeitos colaterais da radioterapia. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent*. 1998; 52 (3): 241-4.

Macfarlane GJ, Macfarlane TV, Lowenfels AB. The influence of alcohol consumption on worldwide trends in mortality from upper aerodigestive tract cancers in men. *J Epidemiol Community Health*. 1996; 50 (6): 636-9.

Massachusetts Institute of Technology. Disponível em URL: <http://ocw.mit.edu> (2006 Dez. 2).

Medes G, Thomas A, Weinhouse S. Metabolism of neoplastic tissue. IV. A study of lipid synthesis in neoplastic tissues slices in vitro. *Cancer Research*. 1953; 13.

Menard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology*. 2001; 61 Suppl 2: 67-72.

Menendez JA, Colomer R, Lupu R. Why does tumor-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? *Med Hypotheses*. 2005b; 64 (2):342-9.

Menendez JA, Lupu R, Colomer R. Targeting fatty acid synthase: potential for therapeutic intervention in her-2/neu-overexpressing breast cancer. *Drug News Perspect*. 2005a; 18 (6): 375-85.

Menendez JA, Mehmi I, Verma VA, Teng PK, Lupu R. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase (FAS): a novel therapeutic approach for breast cancer chemoprevention through its ability to suppress Her-2/neu (erbB-2) oncogene-induced malignant transformation. *Mol Carcinog*. 2004a; 41(3): 164-78.

Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (XenicalTM) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol*. 2005d; 16 (8): 1253-67.

Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Orlistat: from antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB-2)-overexpressing gastrointestinal tumors? *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005c; 230 (3):151-4.

Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R, Lupu R. Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004b; 101(29): 10715-20.

Metges JP, Gibault L, Conan-Charlet V, Lozac'h P, Robaszkiewicz M, Bessaguet C, Lagarde N, Volant A. Reply: Her2 (ErbB2) receptors, a potential therapeutic target in squamous cell carcinoma of oesophagus? *Br J Cancer*. 2006; 94 (8): 1214-5.

Michl P, Downward J. Mechanisms of disease: PI3K/AKT signaling in gastrointestinal cancers. *Z Gastroenterol*. 2005; 43 (10): 1133-9.

Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in *in situ* breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1997; 3 (11): 2115-20

Mimura K, Kono K, Hanawa M, Mitsui F, Sugai H, Miyagawa N, Ooi A, Fujii H. Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2005; 92 (7): 1253-60.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Programas de Controle de Câncer – PRO-ONCO. Estimativa: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em URL: <http://www.inca.org.br>. (2007 Fev 2).

Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis*. 2000; 6 (2): 65-74.

Morrison TB, Wei, JJ e Wittwer, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 1998: 954-62.

Myers RB, Oelschlager DK, Weiss HL, Frost AR, Grizzle WE. Fatty acid synthase: an early molecular marker of progression of prostatic adenocarcinoma to androgen independence. *J Urol*. 2001; 165 (3): 1027-32.

Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, Suzuki T, Gotoh M. Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. *Pathobiology*. 2001; 69 (6): 297-303.

Neville BW, Damm DD, Allen CA, Bouquot JE. *Patologia oral & maxilofacial*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan SA; 1998.

O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles S. Expression and regulation of c-ERBB ligands in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2000; 88 (5): 759-65.

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

Ogden GR. Alcohol and oral cancer. *Alcohol*. 2005; 35 (3): 169-73.

Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res*. 2001; 3 (6): 385-9.

Ookhtens M, Kanna R, Lyon I, Baker N. Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. *Am J Physiol*. 1984; 247 (1): 146-53.

Orlowski M, Wilk S. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 415 (1): 1-5.

Orr MS, O'Connor PM, Kohn KW. Effects of c-erbB2 overexpression on the drug sensitivities of normal human mammary epithelial cells. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92 (12): 987-94.

Oskouian B. Overexpression of fatty acid synthase in SKBR3 breast cancer cell line is mediated via a transcriptional mechanism. *Cancer Lett.* 2000; 149 (1-2): 43-51.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer.* 2001; 94 (2): 153-6.

Paselk RA. Disponível em URL: <http://www.humboldt.edu> (2006 Dez 10).

Penuel E, Schaefer G, Akita RW, Sliwkowski MX. Structural requirements for ErbB2 transactivation. *Semin Oncol.* 2001; 28 (6 Suppl 18): 36-42.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29 (9): 45.

Phillips J, Eberwine JH. Antisense RNA Amplification: A Linear Amplification Method for Analyzing the mRNA Population from Single Living Cells *Methods.* 1996; 10 (3): 283-8.

Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70: 503-33.

Pinto-de-Sousa J, David L, Almeida R, Leitao D, Preto JR, Seixas M, Pimenta A. c-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma. *Int J Surg Pathol.* 2002; 10 (4): 247-56.

Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbürger DC, Grizzle WE. The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol.* 2000; 31 (9): 1068-73.

Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res.* 1998b; 58 (20): 4611-5.

Pizer ES, Jackisch C, Wood FD, Pasternack GR, Davidson NE, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1996a; 56 (12): 2745-7.

Pizer ES, Lax SF, Kuhajda FP, Pasternack GR, Kurman RJ. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma: correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer*. 1998a; 83 (3): 528-37.

Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, Townsend CA, Kuhajda FP. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res*. 2000; 60 (2): 213-8.

Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res*. 1996b; 56 (6): 1189-93.

Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics*. 1989; 4 (3): 362-6.

Priolo C, Tang D, Brahamandan M, Benassi B, Sicinska E, Ogino S, Farsetti A, Porrello A, Finn S, Zimmermann J, Febbo P, Loda M. The Isopeptidase USP2a Protects Human Prostate Cancer from Apoptosis. *Cancer Res*. 2006; 66 (17): 8625-32.

Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramwell VH, Levine MN; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006; 354 (20): 2103-11.

Puskas LG, Zvara A, Hackler L Jr, Van Hummelen P. RNA amplification results in reproducible microarray data with slight ratio bias. *Biotechniques*. 2002; 32 (6): 1330- 4, 1336, 1338, 1340.

Rabindran SK. Antitumor activity of HER-2 inhibitors. *Cancer Lett*. 2005; 227 (1): 9-23.

Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, Kuhajda FP, Hamilton SR. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *Am J Pathol*. 1997; 150 (1): 201-8.

Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer*. 1998; 34 (6): 791-808.

Roskoski R Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 319 (1): 1-11.

Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T, Bubley G, Balk S, Loda M. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res.* 2003; 1 (10): 707-15.

Rossi S, Ou W, Tang D, Bhattacharya N, Dei Tos AP, Fletcher JA, Loda M. Gastrointestinal stromal tumours overexpress fatty acid synthase. *J Pathol.* 2006; 209 (3): 369-75.

Rubin DM, Finley D. Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Curr Biol.* 1995; 5 (8): 854-8.

Sabine JR, Abraham S. Control of lipid metabolism in hepatomas: insensitivity of rate of fatty acid and cholesterol synthesis by mouse hepatoma BW7756 to fasting and to feedback control. *Cancer Res.* 1967; 27 (4): 793-9.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994; 17 (5): 914-21.

Saraiva TF, Castro NP, Pineda PHB, Osório CABT, Camargo LP, Brentani HP, Carraro DM. Effects of Oligo dT-T7 RNA primer in RNA Amplification from Paraffin-Embedded Tissue for Microarray Experiments. *Applied Cancer Research.* 2006, 26 (1): 14-20.

Schaeffer JR, Cohen RE. Differential effects of ubiquitin aldehyde on ubiquitina and ATP-dependent protein degradation. *Biochemistry.* 1996; 35: 10886-93.

Schlecht NF, Franco EL, Pintos J, Negassa A, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP. Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Am J Epidemiol.* 1999; 150 (11): 1129-37.

Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Ng IO, McMillan A, Ziober BL, Le QT, Silverman S, Fu KK. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1999; 35 (3): 333-42.

Scully C. Oncogenes, tumor suppressors and viruses in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1993; 22 (8): 337-47.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol.* 2000; 36 (5): 404-13.

Sebastiani V, Visca P, Botti C, Santeusano G, Galati GM, Piccini V, Capezzone de Joannon B, Di Tondo U, Alo PL. Fatty acid synthase is a marker of increased risk of recurrence in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2004; 92 (1): 101-5.

Semenkovich CF. Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Prog Lipid Res*. 1997; 36 (1): 43-53.

Shurbaji MS, Kuhajda FP, Pasternack GR, Thurmond TS. Expression of oncogenic antigen 519 (OA-519) in prostate cancer is a potential prognostic indicator. *Am J Clin Pathol*. 1996; 97 (5): 686-91.

Signoretti S, Montironi R, Manola J, Altimari A, Tam C, Bublely G, Balk S, Thomas G, Kaplan I, Hlatky L, Hahnfeldt P, Kantoff P, Loda M. Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92 (23): 1918-25.

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

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987; 235 (4785): 177-82.

Smith CJ. Oral cancer and precancer: background, epidemiology and etiology. *Br Dent J*. 1989; 167 (11): 377-83.

Spataro V, Norbury C, Harris AL. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *Br J Cancer*. 1998; 77 (3): 448-55.

Swinnen JV, Esquenet M, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res*. 1997; 57 (6): 1086-90.

Swinnen JV, Heemers H, Deboel L, Foufelle F, Heyns W, Verhoeven G. Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. *Oncogene*. 2000; 19 (45): 5173-81.

Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L, Heyns W, Verhoeven G. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer*. 2002; 98 (1): 19-22.

Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F, Van de Sande T, Heemers H, Heyns W, Verhoeven G. Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 302 (4): 898-903.

Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*. 2003; 9 (6): 2204-12.

Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 285 (2): 217-23.

Ueda S, Ogata S, Tsuda H, Kawarabayashi N, Kimura M, Sugiura Y, Tamai S, Matsubara O, Hatsuse K, Mochizuki H. The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas*. 2004; 29 (1): 1-8.

Van de Sande T, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2002; 62 (3): 642- 6.

Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87 (5): 1663-7.

Visca P, Alo PL, Del Nonno F, Botti C, Trombetta G, Marandino F, Filippi S, Di Tondo U, Donnorso RP. Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res*. 1999; 5 (12): 4111-8.

Visca P, Sebastiani V, Botti C, Diodoro MG, Lasagni RP, Romagnoli F, Brenna A, De Joannon BC, Donnorso RP, Lombardi G, Alo PL. Fatty acid synthase (FAS) is a marker of increased risk of recurrence in lung carcinoma. *Anticancer Res*. 2004; 24 (6): 4169-73.

Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, Botti C, De Carli P, Filippi S, Monaco S, Alo PL. Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res*. 2003; 23 (1A): 335-9.

- Vlad LD, Axaotis CA, Merino MJ Fatty acid synthase is highly expressed in aggressive thyroid tumors. *Mod Pathol*. 1999; 12: 70.
- Wakil SJ. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*. 1989; 28 (11): 4523-30.
- Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol*. 2000; 18 (4): 457-9.
- Wang X, Song KS, Guo QX, Tian WX. The galloyl moiety of green tea catechins is the critical structural feature to inhibit fatty-acid synthase. *Biochem Pharmacol*. 2003; 66 (10): 2039-47.
- Wang Y, Kuhajda FP, Li JN, Pizer ES, Han WF, Sokoll LJ, Chan DW. Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients. *Cancer Lett*. 2001; 167 (1): 99-104.
- Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, Korber E, Kolb HJ. Fatty acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1986; 367 (9): 905-12.
- Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, Frierson HF Jr, Hampton GM. Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res*. 2001; 61 (16): 5974-8.
- Werkmeister R, Brandt B, Joos U. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol*. 2000; 36 (1): 100-5.
- Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent process by deubiquitinating enzymes. *FASEB J*. 1997; 11 (14): 1245:56.
- Wilkinson KD. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*. 2000; 11 (3): 141-8.
- Wilkman TS, Hietanen JH, Malmstrom MJ, Konttinen YT. Immunohistochemical analysis of the oncoprotein c-erbB-2 expression in oral benign and malignant lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998; 27 (3): 209-12.
- Wing SS. Deubiquitinating enzymes--the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35 (5): 590-605.

- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005; 39 (1): 75-85.
- Wünsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol*. 2002; 38 (8): 737-46.
- Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N, Clayman GL, Katz RL, Hung MC. Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1997; 3 (1): 3-9.
- Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, Li L, Katz RL, Hung MC. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res*. 1999; 5 (12): 4164-74.
- Xie D, Shu XO, Deng Z, Wen WQ, Creek KE, Dai Q, Gao YT, Jin F, Zheng W. Population-based, case-control study of HER2 genetic polymorphism and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92 (5): 412-7.
- Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. The Role of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *Breast Cancer*. 2001; 8 (3): 171-83.
- Yang YA, Morin PJ, Han WF, Chen T, Bornman DM, Gabrielson EW, Pizer ES. Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c. *Exp Cell Res*. 2003; 282 (2): 132-7.
- Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*. 2001; 61 Suppl 2: 1-13.
- Zakrzewska JM. Fortnightly review: oral cancer. *BMJ*. 1999; 318 (7190): 1051-4.
- Zhang Y, Guo C, Yu G. A pilot study of fatty acid metabolism in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 34 (1): 78-81.
- Zhou BP, Hung MC. Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. *Semin Oncol*. 2003; 30 (5 Suppl 16): 38-48.
- Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew A, Shanta V, Varghese C, Boffetta P. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer*. 2003; 105 (5): 681-6.
- Zhu B, Xu F, Baba Y. An evaluation of linear RNA amplification in cDNA microarray gene expression analysis. *Mol Genet Metab*. 2005; 87 (1): 71-9.

Ficha clinica para coleta de dados

HOSPITAL DO CÂNCER

Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia

Banco de Tumores Ficha Geral – Sabrina Daniela Silva Wurzba

- 1- I.D..... |__||__||__||__|
- 2- Registro Hospitalar..... |__||__||__||__||__||__||__||__|
- 3- Bloco AP nº:_____
- 4- Idade (anos).....|__||__|
- 5- Sexo: (1) masc (2) fem.....|__|
- 6- Raça: (1) branco (2) negro (3) amarelo (4) outro_____|__|
- 7- Tabagismo (0) não (1) sim (2) Ex (9) ignorado.....|__|
- 8- Etilismo (0) não (1) sim (2) Ex (9) ignorado.....|__|
- 9- Tempo de queixa (meses)..... |__||__||__|
- 10- Localização:|__|
- (1) Lábio, (2) Língua (3) Assoalho (4) Gengiva (5) Retromolar (6) Palato (7) Jugal (8) Amigdalina (9) B de Língua (10) Valécula (11) Orofaringe (12) Outros_____
- 11- Estádio T : T1(1) T2(2) T3(3) T4(4) TX (9).....|__|
12. Estádio N: N0(1) N1(2) N2a(3) N2b(4) N2c(5) N3(6) NX (9)..... |__|
13. Tipo Histológico..... _____
14. Data do início do tratamento..... |__| / |__| / |__|
15. Sequência de tratamento Não(0) Cirurgia(1) RXT(2) QT(3).....|__||__||__|
16. Data da cirurgia: |__| / |__| / |__|
17. Tipo de cirurgia: |__|
- (0) Não (1) Ressecção do tumor (2) 1 + esvaziamento cervical (3) Outra_____

18. Margens cirúrgicas: (1) Livres (2) Exíguas (3) Comprometidas.....|_|
19. Características microscópicas
- a) Embolização ou invasão vascular sanguínea (0) não (1) sim.....|_|
 - b) Embolização ou invasão vascular linfática (0) não (1) sim.....|_|
 - c) Invasão perineural (0) não (1) sim.....|_|
 - d) Espessura da lesão (mm) (999) ignorado.....|_|_|_|
20. Data do início da RXT: |_| / |_| / |_|
21. Dose radioterapia..... _____
22. Tratamento adjuvante: (0) Não (1) Quimioterapia (2)|_|
23. Comprometimento linfonodal:
- a) Total dissecado..... |_|_|_|
 - b) Número comprometido..... |_|_|_|
 - c) Ruptura capsular (0) N - (1) N+ RC - (2) N+ RC+.....|_|
24. Recidiva/Metástase (0) não (1) local (2) linfonodo (3) distância.....|_|_|_|
- 25- Linfonodo: não (0) ipsilateral (1) contra-lateral (2)..... |_|
26. Distância: M0(0) pulmão(1) osso(2) fígado(3) outros(4)_____|_|_|
27. Data da metástase ou recidiva: |_| / |_| / |_|
28. Segunda neoplasia primária:_____
29. Data do diagnóstico do segundo primário.....|_| / |_| / |_|
30. Data da última informação: |_| / |_| / |_|
31. Situação da última informação: |_|
- (1) Vivo sem doença (2) Vivo com doença (3) Morto pela doença (4) Morto durante o tratamento (5) Morto por outra causa (6) Perdido de vista



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CERTIFICADO



Certificamos que o Projeto de pesquisa "Análise da expressão da isopeptidase USP2a e seu substrato, ácido graxo sintase (FAS), em carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço", protocolo CEP nº **145/2004**, dos Pesquisadores **Sabrina Daniela da Silva** e **Edgard Graner**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde - MS e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia - UNICAMP.

We certify that the research project "Expression of the isopeptidase USP2a and its substrate fatty acid synthase (FAS) in head and neck squamous cell carcinoma ", register number **145/2004**, of **Sabrina Daniela da Silva** and **Edgard Graner**, is in agreement with the recommendations of 196/96 Resolution of the National Health Committee - Brazilian Health Department and was approved by the Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas - UNICAMP.

Piracicaba - SP, Brazil, August 09 2004

Cynthia Machado Tabchoury
 Profa. Dra. Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Secretaria
 CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior

Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

CENTRO DE TRATAMENTO E PESQUISA

**HOSPITAL
DO CÂNCER**

A. C. CAMARGO

São Paulo, 29 de julho de 2004.

À

Dra. Sabrina Daniela da Silva

Ref.: Projeto de Pesquisa n.º 618/04

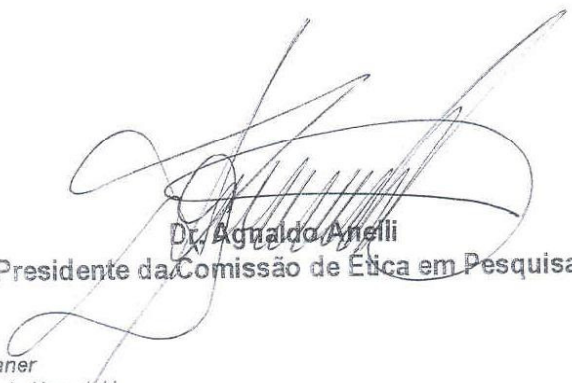
“Análise da expressão da isopeptidase USP2a e seu substrato, ácido graxo sintase (FAZ), em carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço”.

Prezada Doutora:

Seu projeto de pesquisa, acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer em sua última reunião de 28/07/2004. Os membros desta comissão aprovaram a realização deste estudo.

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

Atenciosamente,



Dr. Agnaldo Anelli
Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa

C.C

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

Protocolo para extração de RNA

Extração de RNA usando KIT PICO PURE RNA ISOLATION KIT

1. Após a realização de LCM acrescentar 10µl de *extraction buffer*.
2. Acoplar o *CAP* sobre o *eppendorf* e colocar o conjunto no suporte.
3. Incubar 30 minutos a 42 °C pré-aquecido.
4. Centrifugar o *CAP* a 800xG (0.8 RCF) - temperatura ambiente 2 minutos.
5. Pipetar 250µl de *conditioning buffer* na membrana da coluna de purificação.
6. Incubar a coluna com o *buffer* por 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a coluna a 16000xG por 1 minuto (16 RCF).
8. Descartar o *conditioning buffer*.
9. Pipetar 10µl de ETOH 70% do *KIT* no extrato e homogeneizar bem.
10. O conteúdo (extrato + ETOH) será pipetado sobre a coluna de purificação previamente condicionada.
11. Centrifugar por 2 minutos a 100xG (0.1 RCF).
12. Centrifugar novamente a 16000xG (16 RCF) por 30 segundos.
13. Pipetar 100µl de *wash buffer* 1 na coluna de purificação.
14. Centrifugar 1 minuto a 8000xG (8RCF).
15. Pipetar 100µl de *wash buffer* 2 na coluna de purificação.
16. Centrifugar por 1 minutos a 8000xG (8RCF).
17. Pipetar novamente 100µl de *wash buffer* 2 na coluna de purificação.
18. Centrifugar por 2 minutos a 16000xG (16RCF).
19. Transferir a coluna para outro *eppendorf*.
20. Acrescentar 24µl de *eluation buffer* na membrana.
21. Incubar a coluna por 1 minuto em temperatura ambiente.
22. Centrifugar a coluna por 1 minuto a 1000xG (01 RCF).
23. Centrifugar a coluna por 1 minuto a 16000xG (16RCF) para eluir o RNA.
24. Estocar a – 80°C.

ANEXO 5

Protocolo para amplificação de RNA mensageiro

Baseado em Gomes *et al.*, 2003 com modificações (Saraiva *et al.*, 2006)

Seqüência dos *primers*:

- **Oligo dT(24)-T7 primer:** (5'AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC T(15)3')[57-mer]
- **TS (template switch) oligo primer:** (5' AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG 3') [30-mer]

1. Síntese da Primeira Fita: (ADVANTAGE)

Em um tubo de reação para PCR

6,0 ul RNA total
2,0 ul (oligo dT 0,1 ug/ul) dT24 - T7 primer – Vortex + Spin leve
70 °C por 10 minutos e esfriamento imediato em gelo

Adicionar ao tubo:

4 ul 5X first strand buffer
2 ul 0,1 M DTT
2 ul 10 mM dNTP
1 ul Rnase IN
2 ul Superscript II
Vortex + Spin leve
42 °C por 2 horas em termociclador e esfriamento imediato em gelo

2. Síntese da Segunda Fita: (ADVANTAGE)

19 ul cDNA
64,3 ul DEPC H₂O – *nuclease free water*
10 ul PCR reaction buffer Advantage
1 ul TS (template switch) primer - 0,5 ug/ul
2 µl 10mM dNTP mix
0,7 ul RNase H
2 ul Advantage Polymerase - Vortex + Spin leve

Incubar em termociclador nas temperaturas:

37 °C for 10 min (digestão do RNAm)

94 °C for 3 min (desnaturação)

65 °C for 5 min (anelamento específico)

75 °C for 30 min (extensão)

Parar a reação com solução de 5 ul 1 M NaOH contendo 2 mM EDTA

Incubar em termociclador a 65 °C por 10 minutos para inativar as enzimas

3. cDNA cleanup da dupla fita: (fazer no gelo)

Adicionar ao tubo de PCR:

100 ul fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1 com pH: 8,0)

Adicionar o cDNA dupla fita e misturar bem com a pipeta
Vortex vigorosamente por 1 minuto
Incubar a temperatura ambiente por 5 min
Centrifugar em temperatura ambiente por 15 min a 13200 rpm
Transferir a fase aquosa cuidadosamente para um novo tubo (1,7 ml)

Adicionar:

100 ul de clorofórmio

Vortex vigorosamente por 1 minuto
Incubar a temperatura ambiente por 5 min
Centrifugar em temperatura ambiente por 15 min a 13200 rpm
Transferir a fase aquosa cuidadosamente para um novo tubo (2,0 ml)

Adicionar:

300 ul ETOH absoluto a -20 °C
40 ul NaAc 3 M (pH: 5,2)
1 ul Acrilamida – 5 mg/ml

Vortex vigorosamente por 20 segundos
Incubar a -80 °C por 30 minutos
Centrifugar em temperatura de 4 °C a 14000 rpm por 30 minutos
Transferir a fase aquosa para um novo tubo, e reservá-lo se necessário.

Lavagem do Pellet:

Lavar o pellet 4-5X com 1 ml de ETOH 70% gelado (-20 °C)
Centrifugar em temperatura de 4 °C a 14000 rpm por 3 minutos cada
Secar o pellet em temperatura ambiente ou a 37-42 °C for 10 min
Ressuspender o pellet em 11 ul de H₂O/DEPC
Aquecer a 55 °C por 10 minutos para melhorar a ressuspensão
Estocar cDNA dupla fita a -20 °C

4. Transcrição *In Vitro* (RiboMax)

Master mix:

10 ul cDNA dupla fita
7,5 ul de 25 mM rNTP (A,G,C e UTP, fazer na hora do uso)
5 ul 5X reaction buffer
2,5 ul enzyme mix (Rnase inhibitor and T7 phage polymerase)
Volume final 25 ul
Incubar a 37 °C for 5-6hs

5. Purificação do RNA amplificado (aRNA) usando Trizol

Adicionar:

Realizar todos os procedimentos no gelo:
25 ul de H₂O/DEPC no aRNA
Leve spin

Adicionar:

1 ml de Trizol em cada tubo de transcrição *in vitro* e misturar bem
Vortex vigorosamente por 1 minuto
Leve spin
Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos

Adicionar:

200 ul clorofórmio para cada 1 ml Trizol adicionado
Vortex vigorosamente por 1 minuto
Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos
Centrifugar em temperatura de 4 °C a 12000 rcf por 15 minutos
Transferir a fase aquosa para um novo tubo de 2,0 ml

Precipitação:

Adicionar:

500 ul de Isopropanol para cada 1 ml Trizol adicionado
60 ul NaAc
0,5 ul de glicogênio (20 mg/ml)
Misture bem, vortex por alguns segundos
Leve spin
Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos
Centrifugar em temperatura de 4 °C a 14000 rcf por 30 minutos

Lavar o pellet 4-5X com 1 ml de ETOH 70% gelado em DEPC H₂O (-20 °C)
Centrifugar em temperatura de 4 °C a 14000 rpm por 3 minutos cada
Secar o pellet em temperatura ambiente ou a 37-42 °C for 10 min
Ressuspender o pellet em 6 ul de H₂O/DEPC
Aquecer a 55 °C por 10 minutos para melhorar a ressuspensão

Fatty acid synthase (FAS) expression in oral squamous cell carcinoma of the tongue: clinicopathological findings

SD Silva¹, DE Perez¹, IN Nishimoto³, FA Alves², CAL Pinto³, LP Kowalski³, E Graner¹

¹ Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas (UNICAMP), Av. Limeira 901, CP52, Areão, Piracicaba, CEP 13414-018, São Paulo, Brazil

² Department of Stomatology, A.C. Camargo Cancer Hospital, Rua Prof. Antonio Prudente 211, Liberdade, São Paulo, CEP 01509-010, São Paulo, Brazil

³ Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, A.C. Camargo Cancer Hospital, Rua Prof. Antonio Prudente 211, Liberdade, São Paulo, CEP 01509-010, São Paulo, Brazil

Keywords: oral squamous cell carcinoma; fatty acid synthase; oral cancer; immunohistochemistry;

* Correspondence: Edgard Graner, Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas (UNICAMP); Avenida Limeira 901, CP52, CEP 13414-018, Piracicaba, São Paulo, Brazil; E-mail: egraner@fop.unicamp.br

BACKGROUND: Overexpression of fatty acid synthase (FAS), the cytosolic enzyme responsible for the conversion of dietary carbohydrates to fatty acids, has been reported in several human malignancies and pointed as a potential prognostic marker for some tumors. This study investigates whether FAS immunohistochemical expression is correlated with the clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **MATERIALS AND METHODS:** The clinical features of 102 patients with OSCC of the tongue treated in a single institution were obtained from the medical records and all histopathologic diagnoses reviewed. The expression of FAS was determined by the standard immunoperoxidase technique in formalin-fixed and paraffin-embedded specimens and correlated with the clinicopathological characteristics of the tumors. **RESULTS:** Eighty-one cases (79.41%) were positive for FAS. Microscopic characteristics as histological grade ($p<0.05$), lymphatic permeation ($p<0.001$), perineural infiltration ($p<0.05$), and nodal metastasis ($p<0.02$) were associated with FAS status. A significantly lower survival probability for patients with advanced clinical stage (log-rank test, $p<0.001$), lymph nodes metastasis (log-rank test, $p<0.001$), presence of vascular permeation (log-rank test, $p=0.05$), and perineural invasion (log-rank test, $p=0.01$) was observed in the studied samples. **CONCLUSION:** The expression of FAS in OSCC of the tongue is associated with the microscopic characteristics that determine disease progression and prognosis.

Introduction

Fatty acid synthase (FAS, EC2.3.1.85) is the cytosolic multifunctional enzyme that plays a central role in the endogenous synthesis of long-chain fatty acids from acetyl-CoA and malonyl-CoA (Kuhajda, 2000; Baron *et al*, 2004). Its seven distinct catalytic domains sequentially act to generate the 16-carbon saturated fatty acid palmitate (Brink *et al*, 2002). Normal cells (except liver, lactating breast, fetal lungs and adipose tissue) have low FAS activity because most of the fatty acids are supplied by the diet (Weiss *et al*, 1986; Kuhajda, 2000). On the other hand, there are compelling clinical and experimental evidences that human cancers constitutively express high levels of FAS and consequently have an active endogenous fatty acid biosynthesis, which seems to be independent of the regulatory mechanisms that physiologically downregulate fatty acid production in normal cells (Baron *et al*, 2004; Menendez *et al*, 2005a). FAS expression is up-regulated in a variety of human epithelial cancers, including prostate, breast, ovarian, endometrial, bladder, colon, lung, stomach, thyroid, melanoma, and oral squamous cell carcinoma (OSCC) (Vlad *et al*, 1999; Visca *et al*, 1999; Krontiras *et al*, 1999; Oskouian, 2000; Alo *et al*, 2000; Piyathilake *et al*, 2000; Pizer *et al*, 2001; Dhanasekaran *et al*, 2001; Swinnen *et al*, 2002; Kusakabe *et al*, 2002; Rossi *et al*, 2003; Visca *et al*, 2003; Innocenzi *et al*, 2003; Sebastiani *et al*, 2004; Silva *et al*, 2004; Agostini *et al*, 2004) as well as in soft tissue sarcomas (Takahiro *et al*, 2003; Rossi *et al*, 2006). Moreover, FAS expression is a potential prognostic marker for several tumors, since its expression predicts increased risk of recurrence, metastases, or shorter survival (Alo *et al*, 1996; Shurbaji *et al*, 1996; Gansler *et al*, 1997; Alo *et al*, 1999; Alo *et al*, 2000; Innocenzi *et al*, 2003; Takahiro *et al*, 2003; Visca *et al*, 2004; Sebastiani *et al*, 2004).

The regulation of FAS in cancer cells is complex. Progesterone stimulate FAS expression in breast cancer cell lines (Lacasa *et al*, 2001) and androgens or epidermal growth factor (EGF) up-regulate FAS production and activity in the androgen-dependent prostate cancer cell line LNCaP (Swinnen *et al*, 1997; Swinnen *et al*, 2000; Heemers *et al*, 2001), however, FAS is also overexpressed in androgen-independent prostate cancers (Furuya *et al*, 1997; Pizer *et al*, 2001; Myers *et al*, 2001). Moreover, a direct connection between the cell surface receptor ErbB2 and FAS expression was demonstrated in breast and ovarian cancer cell lines (Kumar-Sinha *et al*, 2003; Menendez *et al*, 2004a; Menendez *et al*, 2004b). In addition to the FAS transcriptional control, FAS protein abundance seems to be posttraditionally controlled in LNCaP cells by ubiquitination and proteasomal degradation (Graner *et al*, 2004).

The exact mechanism by which increased FAS expression occurs in malignant cells has not yet been elucidated. However, it is likely that FAS plays an important role in the malignant cell, since specific inhibitors of its activity (cerulenin, C75, or Orlistat) are able to block cell cycle progression and promote apoptosis in prostate, breast, colon, endometrium, leukemia and pediatric tumor cell lines (Kuhajda *et al*, 1994; Pizer *et al*, 1996a; Furuya *et al*, 1997; Pizer *et al*, 1998; Pizer *et al*, 2000; Kuhajda *et al*, 2000; Pizer *et al*, 2001; Slade *et al*, 2003; Zhou *et al*, 2003; Menendez *et al*, 2004a; Menendez *et al*, 2004c). FAS inhibition was also shown to decrease the size of prostate, breast, and ovarian cancer xenografts (Pizer *et al*, 1996b; Pizer *et al*, 2000; Kridel *et al*, 2004). It has been suggested that FAS has a role in the synthesis of membrane phospholipids (Jackowski *et al*, 2000). In fact, FAS is essential for the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant microdomains in LNCaP cells, which are implicated in

signal transduction, intracellular trafficking, cell polarization, and cell migration (Swinnen *et al*, 2003).

The purpose of the present study was to investigate the expression of FAS by immunohistochemistry in tissue sections obtained from 102 patients with tongue OSCC and verify its association with the clinicopathological features of these tumors.

Material and Methods

Study population

A retrospective study was performed by analyzing 102 patients with OSCC of the tongue diagnosed and treated from 1990 to 1995 at the Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, A.C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil. The eligibility criteria included previously untreated patients with diagnosis of squamous cell carcinoma exclusively localized in the tongue, without a second primary tumor, and submitted to treatment in the institution. Demographic (age, gender, and race), lifestyle (smoking habit and alcohol consumption), clinical (macroscopy, tumor site, and clinical stage), and pathological factors (histological grade, vascular embolization, perineural infiltration, lymphatic permeation, depth, thickness, and surgical margins) were analyzed. The clinical characteristics of these patients were obtained from the medical records and are shown in Table 1. Tumors were staged according to the 2002 version of the International Union Against Cancer (TNM) classification and grouped as early clinical stage (clinical stage I-II) or advanced clinical stage (clinical stage III-IV), all cases followed-up after treatment, being the disease recurrence microscopically confirmed. Histopathological diagnoses were checked by three (SDS, DEP, and CALP) of the authors. The histological grade was determined according to the World Health Organization (Wahi *et al*, 1971) as well-differentiated (Grade I), moderately differentiated (Grade II), or poorly differentiated (Grade III) carcinoma. Vascular embolization was considered when neoplastic cells were found both in the wall and in the lumen of blood or lymphatic vessels, perineural infiltration when the tissue adjacent to the peri and/or intra-tumoral nerves were involved by the tumor cells, surgical margins considered involved when invasive and/or “*in situ*” carcinoma was detected on the margins of the mucosa (margins with less than 5mm were classified as exiguous). Finally, thickness and depth measurements were made using millimetric lens (0/20mm). The thickness measurement was obtained by vertical measurement starting from surface of both the exophytic as well as infiltrative tumors, up to the maximum point of the invasion (Yuen *et al*, 2000). The depth was determined by vertical measurement starting from the line of the mucosa up to the maximum point of the invasion (Kurokawa *et al*, 2002; Gonzalez-Moles *et al*, 2002). This study was carried out with approval of the Human Research Ethics Committee of A.C. Camargo Cancer Hospital and School of Dentistry of Piracicaba, UNICAMP.

Immunohistochemistry

The paraffin embedded tissue samples were cut (3 µm) and mounted on silane-coated glass slides for hematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemistry. Immunodetection of FAS was performed as previously described (Silva *et al*, 2004). Briefly, the sections were deparaffinized, rehydrated in graded ethanol solutions and immersed in 3% H₂O₂ for 25 min at room temperature. Microwave (Panasonic, 1380W) antigen retrieval consisted of two periods of 12 min in 10mM citric acid solution (pH 6.0)

followed by a washing step with phosphate-buffered saline (PBS). The incubations with the primary antibodies anti-FAS (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) diluted in PBS (1:3000) were made overnight at 4°C. Sections were washed again and incubated with biotinylated secondary antibodies for 30 min followed by the streptavidin-biotin-peroxidase (Strept ABC complex/HRP Duet kit, Dako) for 30 min at room temperature. Reactions were developed with a solution containing 0.6 mg/ml of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) and 0.01% H₂O₂ and counter stained with Carazzi's haematoxylin. Positive and negative controls were included in all reactions. The intensities of the immunostaining for FAS were classified as negative, weak or strong in a blinded analysis performed by three of the authors (SDS, DEP, and CALP).

Statistical Analysis

For frequency analysis in contingency tables, statistical analysis of associations between variables were performed by the Fisher's exact test (with significance set for $p < 0.05$) and for continuous variables the non-parametric Mann-Whitney U test. The overall survival was defined as the interval between the beginning of treatment (surgery) and the date of death or the last information for censored observations. The disease free interval was measured from the date of the treatment to the date when recurrence was diagnosed. Overall survival and disease-free survival probabilities were estimated by the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was applied to assess the significance of differences among actuarial survival curves.

Results

The studied population consisted of 102 patients, from which 79 (77.45%) were male and 23 (22.55%) female, with the mean age of 59.2 years, ranging from 31 to 95 years. History of alcohol consumption was observed in 73 (78.49%) of the patients, tobacco smoking reported by 79 (85.87%), and alcohol plus tobacco in 30 (57.7%) of the cases. With regard to the ethnic group, 92 (90.2%) were caucasians and 10 (9.8%) non-caucasians (Table 1). The time of complaint was defined as the time between date of recognition of first sign or symptom of the disease by the patient and the date of first visit to professional who was qualified to refer the patient for definitive diagnosis and treatment. This mean time of complaint was 6.02 months (from 1 to 48 months) and the majority of patients 55 (57.89%) had a time of complaint minor than 4 months. A total of 54 cases (52.94%) were at clinical stage I (T1 + T2) and 48 (47.06%) at clinical stage II (T3+ T4). Thirty-one patients had metastatic cervical lymph nodes (31.31%). With regard to the macroscopic type, 71 (60.61%) were classified as infiltrative and 31 (30.39%) as exophytic (Table 1).

Of the 102 eligible cases, vascular embolization was found in 12 cases (11.76%), perineural infiltration in 34 (33.33%), involved margins in 7 (6.93%) and lymphatic permeation in 43 (42.16%). The tumor thickness in 38 cases was up to 24.38mm. Fifty-four cases (52.94%) were histologically well differentiated (Grade I), 43 cases (42.16%) moderately differentiated or Grade II and 5 cases (4.9%) poorly differentiate or Grade III (Table 1).

Fifty-six (54.9%) patients had tumor recurrence during the study within a mean time of 23.68 months (from 2.7 to 129 months). Local recurrences were detected in 35 (34.31%) patients while 27 (26.47%) patients had the regional lymph nodes involved and 18 (17.67%) developed distant metastasis to lung, bone or brain. At the end of the follow-

up period, 33 (34.02%) patients were alive and 64 (65.98%) dead (Table 1). Fifty-one (52.58%) patients died because of the OSCC, one patient (1.03%) died during the treatment and 12 (12.37%) of other cause, while 5 patients (4.9%) were lost during the follow-up. Overall survival time varied from 1 to 171.1 months (mean of 60.58 ± 53 months and median of 45.33 months). The five-year rates for overall survival (OS) and disease free interval (DFI) were 43.2% and 44.6%, respectively (Figure 1 A and B). The DFI varied from 2 to 129 months, with mean of 23.64 ± 30.67 and median of 8 months.

The immunohistochemical results are summarized in Table 2. Eighty-one cases (79.41%) were positive for FAS. The FAS positivity was cytoplasmic and weak in the adjacent morphologically normal epithelium, where it was restricted to the lower epithelial cell layers (Figure 2A) and the strongest reactions were found in the OSCC samples (Figures 2 B and C). The positivity for FAS was more intense in well differentiated (grade I) than in moderately differentiated (grade II) and poorly/undifferentiated (grade III and IV) tumors (Figures 2 B and C). The expression of FAS was significantly correlated with the histological grade ($p < 0.05$), presence of lymphatic permeation ($p < 0.001$), perineural infiltration ($p < 0.05$), and metastatic lymph nodes ($p < 0.02$) (Table 2).

There was no association between negative, weak or strong positive FAS expression and OS or DFI in this studied population. The 10-year OS for FAS negative plus weakly positive cases and strongly labeled cases were 40.62% and 27.61% respectively ($p = 0.3579$) and the 10-year DFI for the same cases were 41.5% and 32.61% ($p = 0.3621$). However, a significantly lower survival probability for patients with advanced clinical stage (log-rank test, $p < 0.001$) (Figure 3 A), lymph nodes metastasis (log-rank test, $p < 0.001$) (Figure 3 B), presence of vascular permeation (log-rank test, $p = 0.05$) (Figure 3 C) and perineural invasion (log-rank test, $p = 0.01$) (Figure 3 D) was observed in the studied population.

Discussion

Fatty acids are endogenously produced in the cytoplasm of mammalian cells by FAS, whose expression and activity have been described as abnormally high in several human cancers (Krontiras *et al*, 1999; Vlad *et al*, 1999; Oskouian, 2000; Piyathilake *et al*, 2000; Dhanasekaran *et al*, 2001; Kusakabe *et al*, 2002; Swinnen *et al*, 2002; Innocenzi *et al*, 2003; Rossi *et al*, 2003; Visca *et al*, 2003; Takahiro *et al*, 2003; Baron *et al*, 2004; Silva *et al*, 2004; Agostini *et al*, 2004; Rossi *et al*, 2006). FAS immunohistochemical status suggests aggressive behavior and poor prognosis for breast, prostate, ovarian, endometrium, bladder, lung, and colon cancers as well as soft tissue sarcomas and melanomas (Shurbaji *et al*, 1996; Gansler *et al*, 1997; Visca *et al*, 1999; Alo *et al*, 1999; Alo *et al*, 2000; Visca *et al*, 2003; Takahiro *et al*, 2003; Innocenzi *et al*, 2003; Visca *et al*, 2004; Sebastiani *et al*, 2004).

The enhanced expression of FAS in cancer cells provides a potential target for the development of novel therapeutic agents (Kuhajda *et al*, 2000). FAS activity can be specifically inhibited by the natural mycotoxin cerulenin, by the synthetic and more stable compound C75, and by the anti-obesity drug Orlistat (tetrahydrolipstatin; marketed by Roche as XenicalTM) (Kuhajda *et al*, 2000; Kridel *et al*, 2004; Lupu and Menendez, 2006). Endogenously synthesized fatty acids are incorporated into membrane phospholipids by proliferating tumor cells, mainly during the G₁ and S phases of the cell cycle (Jackowski *et al*, 2000). The pharmacological inhibition of FAS results in rapid changes in the lipid composition of tumor cell membranes and reduced cell cycle progression, suggesting that

lipid metabolism is essential for cancer cell proliferation (Kuhajda *et al*, 1994; Swinnen *et al*, 2003; Baron *et al*, 2004). For example, the treatment of cancer cells *in vitro* with cerulenin, a covalent inactivator of the β -ketoacyl synthase active site of FAS promotes apoptosis and is able to delay the progression of human breast and ovarian cancer in xenograph models (Pizer *et al*, 1996b; Pizer *et al*, 2000; Lupu and Menendez, 2006). Human colon and breast cancer cells exposed to C75 showed inhibition of both fatty acid synthesis and DNA replication (Pizer *et al*, 1998). Further studies have suggested that the accumulation of malonyl-CoA as a result of the C75 treatment is the mediator of apoptosis in cancer cells (Pizer *et al*, 2000). Orlistat, a clinically used anti-obesity drug has shown anti-tumor properties towards prostate and breast cancer cells due to its ability to block the lipogenic activity of FAS, which inhibits cell cycle progression and induces apoptosis (Menendez *et al*, 2005b). It is worth noting, however, that FAS knockout mice do not survive even in the presence of a diet rich in fatty acids (Chirala *et al*, 2003) and that FAS inhibition with cerulenin reduces the growth of normal human gingival fibroblasts in primary cultures (Almeida *et al*, 2005).

According to our previous work (Silva *et al*, 2004) and with Krontiras *et al* (1999), the results here presented confirm that the production of FAS is higher in OSCC than in the adjacent morphologically normal epithelium. Interestingly, in contrast with other malignancies, FAS immunohistochemical positivity has been associated with well-differentiated OSCC (Krontiras *et al*, 1999; Silva *et al*, 2004). Experiments performed in our laboratory have shown that FAS expression is regulated during keratinocyte differentiation (Silva SD and Graner E, unpublished observations) rendering the keratinizing well-differentiated OSCC more positive for FAS than its undifferentiated counterparts. The association observed in the present work between histopathological findings such as lymphatic permeation, perineural infiltration, and regional lymph node metastasis and the FAS status suggests that endogenous lipogenesis may facilitate OSCC metastatic spread. The microscopic characteristics cited above and the advanced clinical stage were related with lower survival probability, suggesting that FAS expression may be important for tumor progression and prognosis.

In summary, our results clearly show that FAS expression is higher in OSCC than in the morphologically normal oral epithelium and may have role in the disease progression.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 02/08030-1, 04/13903-0) (CEPID/FAPESP: 9814335). SD Silva is supported by a FAPESP fellowship (04/06398-7), Brazil.

References

- Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, Graner E (2004). Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol*, **40**: 728-735.
- Almeida JP, Coletta RD, Silva SD, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L, Graner E (2005). Proliferation of fibroblasts cultured from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol*, **76**: 272-278.

- Alo PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V, Serpieri DE, Di Tondo U (2000). Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep*, **7**: 1383-1388.
- Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U (1996). Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer*, **77**: 474-482.
- Alo PL, Visca P, Trombetta G, Mangoni A, Lenti L, Monaco S, Botti C, Serpieri DE, Di Tondo U (1999). Fatty acid synthase (FAS) predictive strength in poorly differentiated early breast carcinomas. *Tumori*, **85**: 35-40.
- Baron A, Migita T, Tang D, Loda M (2004). Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem*, **91**: 47-53.
- Brink J, Ludtke SJ, Yang CY, Gu ZW, Wakil SJ, Chiu W (2002). Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 138-143.
- Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, Finegold M, Wakil SJ (2003). Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 6358-6363.
- Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, **412**: 822-826.
- Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H (1997). Apoptosis in androgen independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res*, **17**: 4589-4593.
- Gansler TS, Hardman W, 3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA (1997). Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol*, **28**: 686-692.
- Gonzalez-Moles MA, Esteban F, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Gonzalez-Moles S (2002). Importance of tumour thickness measurement in prognosis of tongue cancer. *Oral Oncol*, **4**: 394-397.
- Graner E, Tang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein LJ, Lechpammer M, Huesken D, Zimmermann J, Signoretti S, Loda M (2004). The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*, **5**: 253-261.
- Heemers H, Maes B, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. (2001) Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol Endocrinol*, **10**: 1817-1828.
- Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G, Ricciardi G, Bosman C, Calvieri S (2003). Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol*, **30**: 23-28.
- Jackowski S, Wang J, Baburina I (2000). Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells. *Biochem Biophys Acta*, **3**: 301-315.
- Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW (2004). Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res*, **64**: 2070-2075.

- Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE, Grizzle WE (1999). Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck*, **21**: 325-329.
- Kuhajda FP (2000). Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*, **16**: 202-208.
- Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, Hennigar RA, Jacobs LB, Dick JD, Pasternack GR (1994). Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **14**: 6379-6383.
- Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA (2000). Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **7**: 3450-3454.
- Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP, Chinnaiyan AM (2003). Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res*, **1**: 132-139.
- Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T (2002). Risk factors for late cervical lymph node metastases in patients with stage I or II carcinoma of the tongue. *Head Neck*, **8**: 731-736.
- Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T (2002). Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology*, **40**:71-79.
- Lacasa D, Le Liepvre X, Ferre P, Dugail I (2001). Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression: potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. *J Biol Chem*, **15**: 11512-1516.
- Lupu R, Menendez JA (2006). Pharmacological inhibitors of Fatty Acid Synthase (FASN)-catalyzed endogenous fatty acid biogenesis: a new family of anti-cancer agents? *Curr Pharm Biotechnol* **7**: 483-494.
- Menendez JA, Colomer R, Lupu R (2005a). Why does tumor-associated fatty acid synthase (oncogenic antigen-519) ignore dietary fatty acids? *Med Hypotheses*, **64**: 342-349.
- Menendez JA, Mehmi I, Verma VA, Teng PK, Lupu R (2004a). Pharmacological inhibition of fatty acid synthase (FAS): a novel therapeutic approach for breast cancer chemoprevention through its ability to suppress Her-2/neu (erbB-2) oncogene-induced malignant transformation. *Mol Carcinog*, **41**:164-178.
- Menendez JA, Oza BP, Atlas E, Verma VA, Mehmi I, Lupu R (2004c). Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity antagonizes estradiol- and tamoxifen-induced agonist transactivation of estrogen receptor (ER) in human endometrial adenocarcinoma cells. *Oncogene*, **28**: 4945-4958.
- Menendez JA, Vellon L, Lupu R (2005b). Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (XenicalTM) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol*. **8**:1253-1267.
- Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, et al (2004b). Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**:10715-10720.
- Myers RB, Oelschlager DK, Weiss HL, Frost AR, Grizzle WE (2001). Fatty acid synthase: an early molecular marker of progression of prostatic adenocarcinoma to androgen independence. *J Urol*, **3**: 1027-1032.

- Oskouian B (2000). Overexpression of fatty acid synthase in SKBR3 breast cancer cell line is mediated via a transcriptional mechanism. *Cancer Lett*, **149**: 43-51.
- Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbürger DC, Grizzle WE (2000). The expression of fatty acid synthase (FAS) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol*, **31**: 1068-1073.
- Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF (1998). Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res*, **20**: 4611-4615.
- Pizer ES, Pflug BR, Bova GS, Han WF, Udan MS, Nelson JB (2001). Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. *Prostate*, **2**: 102-110.
- Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, Townsend CA, Kuhajda FP (2000). Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res*, **2**: 213-218.
- Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP (1996b). Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res*, **56**: 1189-1193.
- Pizer ES, Wood FD, Pasternack GR, Kuhajda FP (1996a). Fatty acid synthase (FAS): a target for cytotoxic antimetabolites in HL60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Res*, **4**: 745-751.
- Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T, Bubley G, Balk S, Loda M (2003). Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res*, **1**: 707-715.
- Rossi S, Ou W, Tang D, Bhattacharya N, Dei Tos AP, Fletcher JA, Loda M (2006). Gastrointestinal stromal tumours overexpress fatty acid synthase. *J Pathol*, **209**: 369-375.
- Sebastiani V, Visca P, Botti C, Santeusano G, Galati GM, Piccini V, Capezzone de Joannon B, Di Tondo U, Alo PL (2004). Fatty acid synthase is a marker of increased risk of recurrence in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, **92**: 101-105.
- Slade RF, Hunt DA, Pochet MM, Venema VJ, Hennigar RA (2003). Characterization and inhibition of fatty acid synthase in pediatric tumor cell lines. *Anticancer Res*, **2**: 1235-1243.
- Shurbaji MS, Kalbfleisch JH, Thurmond TS (1996). Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase (OA-519) as a predictor of progression of prostate cancer. *Hum Pathol*, **27**: 917-921.
- Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA, Kowalski LP, Graner E (2004). Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol*, **40**: 688-696.
- Swinnen JV, Esquenet M, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G (1997). Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res*, **6**: 1086-1090.
- Swinnen JV, Heemers H, Deboel L, Foulle F, Heyns W, Verhoeven G (2000). Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor

- activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. *Oncogene*, **45**: 5173-5181.
- Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L, Heyns W, Verhoeven G (2002). Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer*, **98**: 19-22.
- Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F, Van de Sande T, Heemers H, Heyns W, Verhoeven G (2003). Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochem Biophys Res Commun*, **4**: 898-903.
- Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S (2003). Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*, **9**: 2204-2212.
- Visca P, Alo PL, Del Nonno F, Botti C, Trombetta G, Marandino F, Filippi S, Di Tondo U, Donnorso RP (1999). Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res*, **5**: 4111-4118.
- Visca P, Sebastiani V, Botti C, Diodoro MG, Lasagni RP, Romagnoli F, Brenna A, De Joannon BC, Donnorso RP, Lombardi G, Alo PL (2004). Fatty acid synthase (FAS) is a marker of increased risk of recurrence in lung carcinoma. *Anticancer Res*, **24**: 4169-4173.
- Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, Botti C, De Carli P, Filippi S, Monaco S, Alo PL (2003). Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res*, **23**: 335-339.
- Vlad, LD, Axiots, CA, Merino, MJ, *et al* (1999). Fatty acid synthase is highly expressed in aggressive thyroid tumors. *Mod Pathol* **12**, 70.
- Wahi, PN, Cohen, B; Luthra, UK, Torloni, H (1971). Histological typing of oral and oropharyngeal tumours. Geneva. *World Health Organization*, 28.
- Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, Korber E, Kolb HJ (1986). Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **367**: 905-912.
- Yuen P, Lam KY, Wei WI, Lam KY, Ho CM, Chow TL, Yuen WF (2000). A comparison of the prognostic significance of tumor diameter, length, width, thickness, area, volume, and clinicopathological features of oral tongue carcinoma. *Am J Surg*, **2**: 139-143.
- Zhou W, Simpson PJ, McFadden JM, Townsend CA, Medghalchi SM, Vadlamudi A, Pinn ML, Ronnett GV, Kuhajda FP (2003). Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res*, **21**:7330-7337.

ErbB2 and Fatty Acid Synthase (FAS) expression in squamous cell carcinoma of the tongue: Correlation with clinical outcomes

Sabrina D. Silva ^a, Danyel E. Perez ^a, Fabio A. Alves ^b, Inês N. Nishimoto ^b, Clóvis A.L. Pinto ^b, Luiz P. Kowalski ^b, Edgard Graner ^{a*}

^a *Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas - UNICAMP, Av. Limeira 901, CP52, Areão, Piracicaba, CEP 13414-018, São Paulo, Brazil*

^b *Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, A.C. Camargo Cancer Hospital, Rua Prof. Antonio Prudente 211, Liberdade, São Paulo, 01509-010, Brazil*

* Corresponding author. Address: Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas – UNICAMP, Avenida Limeira 901, CP 52, CEP 13414-018, Piracicaba, SP, Brazil; Tel.: +55-19-3412-5318; Fax: +55-19-3412-5218. E-mail address: egraner@fop.unicamp.br (E. Graner).

Summary The oncoprotein ErbB2 (HER-2/neu) is a tyrosine kinase cell surface receptor overexpressed in several human malignancies including oral squamous cell carcinoma (OSCC). ErbB2 was recently shown to regulate the expression of fatty acid synthase (FAS), a multifunctional enzyme complex involved in the *de novo* biosynthesis of saturated fatty acids. Here, we evaluated the relationship between the immunohistochemical expression of ErbB2, FAS and Ki-67 with the clinicopathologic characteristics of tongue OSCC. One hundred and two patients with tongue OSCC treated from 1990 to 1995 were studied. Clinical and treatment data were obtained from the medical records and histopathological features revised. Paraffin-embedded tissues were submitted to standard immunohistochemical reactions for ErbB2, FAS and Ki-67. A strong positive correlation between ErbB2 labeling at the cell membrane and FAS expression was found in the tongue OSCC samples ($p < 0.0001$). The cytoplasmatic expression of ErbB2 as well as Ki-67 nuclear staining were significantly associated with a high risk of recurrence by predicting both disease free survival (log-rank test, $p = 0.0096$ and $p = 0.0047$, respectively) and overall survival (log-rank test, $p = 0.0029$ and $p = 0.0001$, respectively). Taken together, our results suggest that the immunolocalization of ErbB2 at the cell surface of malignant oral keratinocytes is linked to FAS expression while the intracytoplasmic ErbB2 staining and Ki-67 positivity predict high risk of recurrence of tongue OSCC.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; oral cancer; ErbB2, fatty acid synthase; Ki-67, prognostic factor, survival analysis.

Introduction

ErbB2 (HER-2/neu) is a tyrosine kinase transmembrane receptor that belongs to the same family of epidermal growth factor receptor (EGFR) or ErbB1/HER-1, ErbB3/HER-3, and ErbB4/HER-4. The ErbB2 receptor (~185 kDa) lacks a specific ligand and is encoded by a gene located on chromosome 17 (17q12-q21.32).¹ It can be activated by heterodimerization with the other receptors of the family and has effects on cell proliferation, differentiation, adhesion or migration as well as in tumor invasion through mitogen-activated protein kinase (MAPK) or phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT activated pathways.²

The ErbB2 gene was isolated in rat neuro- and glioblastomas based on its ability to transform NIH3T3 cells.^{3,4} Since then, overexpression of this oncoprotein has been detected in several human malignant neoplasms. ErbB2 is amplified and overexpressed in approximately 30% of human ovarian and breast tumors,⁵ and high expression of this gene product has been reported in a variety of human tumors, including esophagus, stomach, lung, colon, pancreas, bladder and head and neck carcinomas.⁶⁻¹³ Besides the fact that strong membrane immunostaining for ErbB2 is frequently associated with gene amplification, it also seems to predict reduced survival rates and aggressive phenotype as well as to influence the response for chemotherapy.¹⁴⁻¹⁷ In addition, ErbB2 has been used as a molecular target for the treatment of breast cancer patients since its blockage with humanized monoclonal antibodies inhibits tumor growth and increases the survival rates of metastatic breast cancer patients.¹⁸

Recently, a transcriptome analysis revealed a molecular connection between the ErbB2 protein and the lipogenic enzyme fatty acid synthase (FAS) in the human mammary gland epithelial cell line H16N2.¹⁹ FAS is the cytosolic enzyme responsible for the endogenous synthesis of saturated long-chain fatty acids from substrates acetyl-CoA and malonyl-CoA.^{20,21} Its expression is up-regulated in several human epithelial malignancies,^{20,22-25} including oral squamous cell carcinoma (OSCC).²⁶⁻²⁸ It was experimentally demonstrated that the overexpression of human ErbB2 in mouse fibroblasts stimulates the FAS protein expression through a PI3K-dependent pathway.^{29,30} FAS is essential for cell proliferation since its specific inhibition reduces cell growth, blocks DNA replication and promotes apoptosis in several cancer cell lines,^{27,31-35} being also able to decrease the size of prostate and breast cancer xenographs.^{36,37} Importantly, both pharmacological and RNAi-mediated inhibition of FAS specifically down-regulated ErbB2 expression in breast and ovarian cancer cells through the up-regulation of its transcriptional repressor PEA3.³⁸

In order to further investigate the relationship between ErbB2 and FAS expression in OSCC, we conducted the present immunohistochemical and clinicopathological study with 102 tongue OSCC cases followed-up for 150 months. In addition, we evaluated the positivity for Ki-67 as a proliferation and prognostic marker in the same OSCC samples.

Materials and Methods

A retrospective study was performed by analyzing 102 patients with tongue OSCC diagnosed and treated from 1990 to 1995 at the Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, A.C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil. The eligibility criteria included previously untreated patients with diagnosis of squamous cell carcinoma exclusively localized in the tongue, without a second primary tumor and submitted to treatment in the institution. In this study, demographic factors (age, gender and race), lifestyle factors (smoking habit, alcohol consumption), clinical factors (macroscopy, tumor

site, clinical stage) and pathological factors (histological grade) were analyzed. The clinical characteristics of these patients were obtained from the medical records and the tumors staged according to the 2002 version of the International Union Against Cancer (TNM) classification and grouped as early clinical stage (clinical stage I-II) or advanced clinical stage (clinical stage III-IV). All studied cases were followed-up after treatment, being the disease recurrence microscopically confirmed. Histopathological diagnoses were checked and the histological grade determined on the basis of classification proposed by the World Health Organization³⁹ as well differentiated (Grade I), moderately differentiated (Grade II), or poorly differentiated (Grade III). This study was carried out with approval of the Human Research Ethics Committee of A.C. Camargo Cancer Hospital and School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas.

Immunohistochemistry

The paraffin embedded tissue samples were cut (3 µm) and mounted on silane-coated glass slides for hematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemistry. Immunodetection of ErbB2, FAS and Ki-67 was performed as previously described.²⁶ Briefly, the sections were deparaffinized, rehydrated in graded ethanol solutions and immersed in 3% H₂O₂ for 25 min at room temperature. Microwave (Panasonic, 1380W) antigen retrieval consisted of two periods of 12 min in 10mM citric acid solution (pH 6.0) followed by a washing step with phosphate-buffered saline (PBS). The incubations with the primary antibodies diluted in PBS were made overnight at 4°C: anti-ErbB2 (Dako, Carpinteria, CA) 1:200, anti-FAS (Transduction Laboratories, Lexington, KY) 1:3000, and anti-Ki-67 (Dako, Carpinteria, CA) 1:200. Sections were washed again and incubated with biotinylated secondary antibodies for 30 min followed by the streptavidin-biotin-peroxidase (Strept ABC complex/HRP Duet kit, Dako) for 30 min at room temperature. Reactions were developed with a solution containing 0.6 mg/ml of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) and 0.01% H₂O₂ and counter stained with Carazzi's haematoxylin. Positive and negative controls were included in all reactions. The intensity of the immunolabeling was classified as negative, weak or strong for ErbB2 or FAS in a blinded analysis performed independently by three of the authors (SDS, DEP, and CALP). The percentage of Ki-67 positive nuclei was calculated with the aid of an image computer analyzer (Kontron 400, Carl Zeiss, Germany).

Statistical Analysis

For frequency analysis in contingency tables, statistical analyses of associations between variables were performed by the Fisher's exact test (with significance set for $p < 0.05$) and for continuous variables the non-parametric Mann-Whitney U test. The overall survival was defined as the interval between the beginning of treatment (surgery) and the date of death or the last information for censored observations. The disease free interval was measured from the date of the treatment to the date when recurrence was diagnosed. Overall survival and disease-free survival probabilities were estimated by the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was applied to assess the significance of differences among actuarial survival curves.

Results

The immunohistochemical results are summarized in Table 1. Two distinct patterns of ErbB2 positivity were identified. The first was characterized by a sharply demarcated cell membrane staining found in the stratum spinosum and granulosum of the adjacent morphologically normal oral epithelium as well as in well-differentiated tumors, mainly in

areas close to the keratin pearls (Fig. 1A). The second pattern of ErbB2 positivity was intracytoplasmic, observed in undifferentiated tumor cells (Fig. 1B) and more frequent in lesions with advanced clinical stage ($p<0.05$) (Table 1).

The FAS positivity was intracytoplasmic and weak in the morphologically normal epithelium, where it was restricted to the lower epithelial cell layers (Fig. 1C and 1D). The strongest reactions were found in the OSCC samples (Fig. 1D and 1E). Eighty-one cases (79.41%) were positive for FAS and this positivity was more intense in well-differentiated (grade I) than in moderately differentiated (grade II) or poorly/undifferentiated (grade III and IV) tumors ($p<0.02$) (Fig. 1E and Table 1).

A similar percentage of the cases was strongly positive for FAS and ErbB2 (79.41% and 77.45%, respectively), with a statistically significant positive correlation between FAS expression and ErbB2 positivity at the cell membrane ($p<0.001$). Interestingly, an inverse correlation between the FAS positivity and the ErbB2 cytoplasmic staining was observed in the same samples ($p<0.001$). When well- and undifferentiated tongue OSCC samples were compared, ErbB2 at the cell membrane was positively associated with FAS staining ($p<0.001$) and both inversely correlated with the ErbB2 in the cytoplasm ($p<0.001$).

The cell proliferation index was estimated by the Ki-67 antigen positivity, which was easily identified in all studied samples (Fig. 1F). Nuclei with brown color, regardless their intensities were considered as positive. The expression of Ki-67 was significantly associated with the advanced clinical stage ($p<0.05$), moderately and poorly/undifferentiated histological grade ($p<0.05$) (Table 1), and cytoplasmic ErbB2 staining ($p<0.01$). There was no correlation between the Ki-67 index and the expression of FAS or ErbB2 at the cell membrane. Curiously, Ki-67 staining was stronger in patients over 59 years ($p<0.05$, Table 1).

Importantly, our data show that intracytoplasmic ErbB2 immunolabeling was able to predict the survival probability (Fig. 2A), since patients whose tumors showed strong intracytoplasmic ErbB2 expression had shorter survival rates than patients with negative or weak reactions. The 10-year OS for the strongly positive and negative or weak ErbB2 cases was 24.06% and 53.42% respectively, and a significant difference between the survival curves was observed (log-rank test, $p=0.0096$). In the same way, there was a significant association between ErbB2 expression in the cytoplasm and the 10-year DFI, which was 56.53% for the negative or weak cases and 28.82% for the strongly positive cases (log-rank test, $p=0.0029$) (Fig. 2 B). Additionally, Ki-67 was also significantly associated with a higher risk of recurrence because it predicted both overall survival (log-rank test, $p=0.0001$) (Fig. 2C) and disease free survival (log-rank test, $p=0.0047$) (Fig. 2D). There were no associations between the expression of FAS or ErbB2 at the cell membrane with OS or DFI in the studied population.

Discussion

In the present study we describe the expression of ErbB2 in OSCC samples exclusively localized in the tongue, which were diagnosed, treated and followed-up for 150 months in the same institution. ErbB2 overexpression and gene amplification in OSCC have been described by several authors⁴⁰⁻⁴⁴ and associated with shorter survival, local and distant metastasis and early recurrence. However, Khademi et al. (2002)⁴⁵ did not find a correlation between ErbB2 expression and the histological grade or nodal involvement in head and neck squamous cell carcinoma patients. Some discrepant data regarding the

expression of this cell surface receptor in OSCC may be consequence of the clinical stage or primary site of the lesions, modality of treatment or research methodology.

Herein we show that ErbB2 is preferentially expressed at the cell membrane in the morphologically normal epithelium adjacent to the tumors and in well-differentiated OSCC. Intense intracytoplasmatic labeling for ErbB2 was also observed in our cases, which is probably related to alterations in receptor internalization, proteolytic degradation or accumulation of newly synthesized molecules. In fact, this pattern of ErbB2 positivity has been described in colorectal, pancreatic, and lung carcinomas^{9,11,47} and was clearly associated with advanced tongue OSCC in the present work. In our well-differentiated tongue OSCC, ErbB2 was present at the cell membrane in areas close to the keratin pearls, while poorly-differentiated OSCC expressed ErbB2 in the cytoplasm only. The positivity for ErbB2 at the cell membrane was inversely correlated to its cytoplasmic staining, which was in turn correlated with cell proliferation, as measured by the Ki-67 index. Both cytoplasmic ErbB2 and Ki-67 were associated with a higher risk of recurrence and shorter survival. These findings may have clinical implications since the qualitative assessment (membrane and/or cytoplasm) of ErbB2 expression associated with the Ki-67 index could be useful to select more adequate treatment protocols or to predict disease outcome.

Our results also demonstrate a significant correlation between ErbB2 at the cell surface and FAS positivity. A direct bi-directional connection between the expression of this receptor and FAS was experimentally evidenced by Menendez et al.³⁰ According to these authors, the inhibition of FAS expression by means of RNAi or its natural specific inhibitor cerulenin down-regulates ErbB2 mRNA in breast and ovarian cancer cell lines.^{30,39} Moreover, the association of cerulenin with Trastuzumab (Herceptin) synergistically enhances apoptotic cell death in a breast cancer cell line.³⁹ In addition, ErbB2 overexpressing NIH-3T3 cells show high FAS protein levels and cerulenin is able to inhibit their growth in soft agar as well as to induce enhanced apoptotic cell death, in comparison with the wild type cells.³¹ In the last few years, FAS expression and activity have been described as abnormally high in several human cancers,^{20,22-26} including OSCC,²⁷⁻²⁹ and associated with poor prognosis.^{23,24,48-54} The results presented here suggest that the co-expression of FAS and ErbB2 at the cell surface indicate favorable prognosis. In contrast with other malignancies, FAS expression in OSCC is higher in well-differentiated than in poorly differentiated lesions^{27,29} and may be explained by the participation of this enzyme in the keratinization process (Silva S.D. and Graner E., University of Campinas, Brazil). However, FAS specific inhibition in OSCC cell lines effectively reduces cell growth^{28,55} and points this anabolic enzyme as a target for OSCC chemotherapy or chemoprevention.

In summary, our results clearly show that tongue OSCC cases with strong intracytoplasmic ErbB2 expression and high Ki-67 index had a significantly shorter survival and recurrence time than those with low or negative expression of these proteins. In addition, ErbB2 expression at the tumor cell membrane was positively correlated with FAS expression in well-differentiated OSCC.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 02/08030-1 and CEPID/FAPESP 9814335). Silva SD is supported by a FAPESP fellowship (04/06398-7).

References

1. Popescu NC, King CR, Kraus MH. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics* 1989; **4**(3): 362-366.
2. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; **19**(13): 3159-3167.
3. Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, Ullrich A, Coussens L. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985; **229**(4717): 976-978.
4. Bargmann CI, Hung M-C, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 1986; **319**: 226-230.
5. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; **244**(4905): 707-712.
6. Mimura K, Kono K, Hanawa M, Mitsui F, Sugai H, Miyagawa N, Ooi A, Fujii H. Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2005; **92**(7): 1253-1260.
7. Albuquerque RL Jr, Miguel MC, Costa AL, Souza LB. Correlation of c-erbB-2 and S-100 expression with the malignancy grading and anatomical site in oral squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol* 2003; **84**(6): 259-265.
8. Pinto-de-Sousa J, David L, Almeida R, Leitao D, Preto JR, Seixas M, Pimenta A. c-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma. *Int J Surg Pathol* 2002; **10**(4): 247-256.
9. Ueda S, Ogata S, Tsuda H, Kawarabayashi N, Kimura M, Sugiura Y, Tamai S, Matsubara O, Hatsuse K, Mochizuki H. The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2004; **29**(1): 1-8.
10. Eissa S, Ali HS, Al Tonsi AH, Zaglol A, El Ahmady O. HER2/neu expression in bladder cancer: relationship to cell cycle kinetics. *Clin Biochem* 2005; **38**(2): 142-148.
11. Cheng CM, Tsuneyama K, Matsui K, Takahashi H, Ishizawa S, Takano Y. Cytoplasmic expression of c-erbB2 in non-small cell lung cancers. *Virchows Arch* 2005; **446**(6): 596-603.
12. Khan AN, Yang W, Seifalian AM, Winslet MC. HER2 (ErbB2) receptors, a potential therapeutic target in squamous cell carcinoma of oesophagus. *Br J Cancer* 2006; **94**(8): 1213-1215.
13. Metges JP, Gibault L, Conan-Charlet V, Lozac'h P, Robaszkiewicz M, Bessaguet C, Lagarde N, Volant A. Reply: Her2 (ErbB2) receptors, a potential therapeutic target in squamous cell carcinoma of oesophagus? *Br J Cancer* 2006; **94**(8): 1214-1215.
14. Brand FX, Ravanel N, Gauchez AS, Pasquier D, Payan R, Fagret D, Mousseau M. Prospect for anti-HER2 receptor therapy in breast cancer. *Anticancer Res* 2006; **26**(1B): 463-470.
15. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramwell VH, Levine MN; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; **354**(20): 2103-2111.
16. Eccles SA. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; **6**(4): 393-406.
17. Menard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology* 2001; **61**(2): 67-72.

18. Yeon CH, Pegram MD. Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER-2-amplified breast cancer. *Invest New Drugs* 2005; **23**: 391-409, 2005.
19. Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res* 2003; **63**(1): 132-139.
20. Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem* 2004; **91**(1): 47-53.
21. Jayakumar A, Tai MH, Huang WY, al-Feel W, Hsu M, Abu-Elheiga L, et al. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci* 1995;**92**(19):8695–8699.
22. Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G, Ricciardi G, Bosman C, Calvieri S. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol* 2003; **30**(1): 23-28.
23. Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 2003; **9**(6):2204-2212.
24. Alo PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V, Serpieri DE, Di Tondo U. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep* 2000; **7**(6): 1383-1338.
25. Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology* 2002; **40**(1): 71-79.
26. Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA, Kowalski LP, Graner E. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol* 2004; **40**(7): 688-696.
27. Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, Graner E. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2004; **40**(7): 728-735.
28. Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE, Grizzle WE. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck* 1999; **21**(4): 325-329.
29. Menendez JA, Lupu R, Colomer R. Targeting fatty acid synthase: potential for therapeutic intervention in her-2/neu-overexpressing breast cancer. *Drug News Perspect* 2005; **18**(6): 375-385.
30. Menendez JA, Mehmi I, Verma VA, Teng PK, Lupu R. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase (FAS): a novel therapeutic approach for breast cancer chemoprevention through its ability to suppress Her-2/neu (erbB-2) oncogene-induced malignant transformation. *Mol Carcinog* 2004; **41**(3): 164-178.
31. Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H. Apoptosis in androgen independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res* 1997; **17**(6D): 4589–4593.
32. Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; **58**(20): 4611–4615.
33. Li JN, Gorospe M, Chrest FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WF, et al. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res* 2001; **61**(4): 1493–1499.

34. Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the acetyl-CoA-carboxylase- α gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2005; **65**(15): 6719-6725.
35. Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (XenicalTM) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol* 2005; **16**(8): 1253-1267.
36. Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res* 2004; **64**(6): 2070-2075.
37. Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, Townsend CA, Kuhajda FP. Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res* 2000; **60**(2): 213-218.
38. Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, Oza BP, Ropero S, Colomer R, Lupu R. Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(29): 10715-10720.
39. Wahi, P. N; Cohen, B; Luthra, Usha K; Torloni, Humberto. Histological typing of oral and oropharyngeal tumours. Geneva. *World Health Organization*, 1971. p. 28.
40. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N, Clayman GL, Katz RL, Hung MC. Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997; **3**(1): 3-9.
41. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, Li L, Katz RL, Hung MC. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res* 1999; **5**(12): 4164-4174.
42. Werkmeister R, Brandt B, Joos U. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol* 2000; **36**(1): 100-105.
43. Bei R, Pompa G, Vitolo D, Moriconi E, Ciocci L, Quaranta M, Frati L, Kraus MH, Muraro R. Co-localization of multiple ErbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001; **195**(3): 343-348.
44. Khan AJ, King BL, Smith BD, Smith GL, DiGiovanna MP, Carter D, Haffty BG. Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; **8**(2): 540-548.
45. Khademi B, Shirazi FM, Vasei M, Doroudchi M, Gandomi B, Modjtahedi H, Pezeshki AM, Ghaderi A. The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Lett* 2002; **184**(2): 223-230.
46. Half E, Broaddus R, Danenberg KD, Danenberg PV, Ayers GD, Sinicrope FA. HER-2 receptor expression, localization, and activation in colorectal cancer cell lines and human tumors. *Int J Cancer* 2004; **108**(4): 540-548.
47. Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 1996; **77**(3): 474-482.
48. Gansler TS, Hardman W, 3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol* 1997; **28**(6): 686-692.

49. Shurbaji MS, Kalbfleisch JH, Thurmond TS. Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase (OA-519) as a predictor of progression of prostate cancer. *Hum Pathol* 1996; **27**(9): 917-921.
50. Visca P, Sebastiani V, Botti C, Diodoro MG, Lasagni RP, Romagnoli F, Brenna A, De Joannon BC, Donnorso RP, Lombardi G, Alo PL. Fatty acid synthase (FAS) is a marker of increased risk of recurrence in lung carcinoma. *Anticancer Res* 2004; **24**(6): 4169-4173.
51. Sebastiani V, Visca P, Botti C, Santeusano G, Galati GM, Piccini V, Capezzone de Joannon B, Di Tondo U, Alo PL. Fatty acid synthase is a marker of increased risk of recurrence in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; **92**(1): 101-105.
52. Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, Botti C, De Carli P, Filippi S, Monaco S, Alo PL. Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res* 2003; **23**(1A): 335-339.
53. Alo PL, Visca P, Trombetta G, Mangoni A, Lenti L, Monaco S, Botti C, Serpieri DE, Di Tondo U. Fatty acid synthase (FAS) predictive strength in poorly differentiated early breast carcinomas. *Tumori* 1999; **85**(1): 35-40.
54. Zhang Y, Guo C, Yu G. A pilot study of fatty acid metabolism in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; **34**(1):78-81.

Expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in morphologically normal, premalignant and malignant oral keratinocytes

Sabrina D Silva¹, Ana Lúcia CA Rangel¹, Jacks Jorge¹, Karina G Zecchin², Michelle Agostini¹, Ricardo D Coletta¹ and Edgard Graner¹

¹ Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brasil.

² Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brasil.

Correspondence: Edgard Graner, Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP; Avenida Limeira 901, CP 52, CEP: 13414-018, Piracicaba, São Paulo, Brasil; E-mail: egraner@fop.unicamp.br

Fatty acid synthase (FAS) is the cytosolic enzyme responsible for the endogenous synthesis of saturated long-chain fatty acids from acetyl-CoA and malonyl-CoA. Its expression is up regulated in several human epithelial malignancies, including oral squamous cell carcinoma (OSCC), and soft tissue sarcomas. In contrast with all FAS-overexpressing tumors, FAS production in OSCC has been shown to be more pronounced in well-differentiated than in undifferentiated lesions. Besides its androgen or epithelial growth factor (EGF) regulation in prostate cancer cells, it has been recently shown a connection between the cell surface receptor ErbB2 and FAS expression in breast and ovarian cancer cells. The exact role of FAS in the malignant cell is not known, however, it is clear that FAS specific inhibitors block cell cycle progression and induce apoptosis in cancer cell lines. Herein we show by immunohistochemistry that FAS expression is higher in oral hyperkeratosis, epithelial dysplasias and OSCC than in morphologically normal oral epithelium. According to previous results, well-differentiated OSCC were more positive for FAS than undifferentiated tumors. ErbB2 expression was observed at the cell surface of non-tumoral and well-differentiated OSCC keratinocytes, whereas its cytoplasmic localization was mainly observed in undifferentiated tumor cells. The Ki-67 index was progressively higher from the normal oral epithelium to OSCC, and positively correlated with the ErbB2 cytoplasmic labeling. We also demonstrated that the suspension-induced differentiation of an OSCC cell line increases the number ErbB2-positive cells. Taken together, these findings suggest that FAS is involved in the cell proliferation of OSCC cells and that hyperkeratotic oral epithelium express more FAS than the morphologically normal oral epithelium. Moreover, ErbB2 was found mainly at the cell membrane during the differentiation of OSCC cells in culture as well as in the normal or hyperkeratotic oral epithelium.

Keywords: ErbB2; fatty acid synthase; Ki-67; oral cancer; SCC-9; squamous cell carcinoma

Introduction

Fatty acid synthase (FAS, EC2.3.1.85) is the cytosolic multifunctional enzyme responsible for the endogenous synthesis of saturated long-chain fatty acids from acetyl-CoA and malonyl-CoA^{1, 2}. FAS is arranged as a homodimer and each ~250 kDa polypeptide chain contains seven distinct catalytic sites that sequentially act to generate the 16-carbon saturated fatty acid palmitate³. Normal cells (with exception of liver, lactating breast, fetal lung, and adipose tissue) have low FAS activity because most of the fatty acids are supplied by the diet^{1, 4}. However, despite its apparently marginal role in adult tissues FAS is essential during embryogenesis, since *Fasn*^{-/-} and *Fasn*^{+/-} mice die *in utero* even in the presence of a diet rich in saturated fatty acids⁵. It has been recently demonstrated that FAS expression is up regulated in a variety of human epithelial cancers, including prostate, breast, ovarian, bladder, lung, melanoma and stomach⁶⁻¹³ as well as in soft tissue sarcomas¹⁴. Moreover, FAS expression seems to be a potential prognostic marker for several tumors¹⁵⁻¹⁸. FAS expression and activity are elevated in oral squamous cell carcinoma (OSCC)¹⁹⁻²², however, in contrast with the other FAS-overexpressing malignancies, well-differentiated OSCC produce more FAS than their undifferentiated counterparts^{20, 21}. The exact role of FAS in malignant cells is not known, however, FAS specific inhibitors block cell cycle progression and cause apoptosis in prostate, breast, colon and promyelocytic leukemia cancer cell lines²³⁻²⁵. Similarly, OSCC cell lines exposed to the FAS inhibitor cerulenin show reduced proliferation and enhanced apoptotic cell death^{19, 26}. Moreover, inhibition of FAS activity decreases the size of prostate and ovarian cancer xenografts^{6, 27, 28}.

The regulation of FAS production is complex. Progesterone stimulate FAS expression in breast cancer cell lines²⁹ and androgens or epidermal growth factor (EGF) up-regulate FAS production and activity in the androgen-dependent prostate cancer cell line LNCaP³⁰⁻³³. However, FAS is also over expressed in androgen-independent prostate cancers^{27, 34}. Recent experimental evidences demonstrate a direct connection between the cell surface receptor ErbB2 and FAS expression in cancer cells^{35, 36}. Previous work from our laboratory showed that OSCC cell lines have very low androgen receptor protein and high ErbB2 protein levels¹⁹ and that the expression of the latter is positively correlated with the FAS protein amount in OSCC tissue samples²¹. Besides its transcriptional control, it was recently shown that the FAS protein can be ubiquitinated and degraded by proteasomes in LNCaP prostate cancer cells, phenomenon that can be reversed by the interaction with the isopeptidase USP2a³⁷.

To further investigate the role of FAS and ErbB2 in OSCC, we performed immunohistochemical reactions in tissue sections obtained from morphologically normal, dysplastic and hyperkeratotic oral epithelium, well differentiated and poorly differentiated OSCC. Additionally, in order to better understand the distribution and verify a possible connection between FAS and ErbB2 in OSCC, we describe the expression of these molecules during the keratinization process using a cell culture model.

Materials and methods

Immunostaining

The tissue samples included in this study were obtained from the archives of the Orocentro (Center for the Diagnosis and Treatment of Oral Diseases, University of Campinas, Brazil) and comprised 9 fibrous hyperplasias, 9 hyperkeratosis, 20 epithelial

dysplasias and 28 OSCC (all histopathological diagnosis were checked). The main clinical characteristics of the 68 studied cases are shown in Table 1. The degree of epithelial dysplasia as well as the differentiation of OSCC samples ³⁸ were determined by three (SDS, JJ and EG) and two (SDS and EG) of the authors, respectively. The paraffin embedded samples were cut (3 μ m) and mounted on silane-coated glass slides for haematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemistry. Immunodetection of FAS, ErbB2, and Ki-67 was performed as previously described ^{7, 39}. Briefly, the sections were deparaffinized, rehydrated in graded ethanol solutions and immersed in 3% H₂O₂ for 25 min at room temperature. Microwave (Panasonic, 1380W) antigen retrieval consisted of two periods of 12 min in 10 mM citric acid solution (pH 6.0) followed by a washing step with phosphate-buffered saline (PBS). The incubations with the primary antibodies diluted in PBS were made overnight at 4°C: anti-FAS (Transduction Laboratories, Lexington, KY) 1:3,000, anti-ErbB2 (Dako, Carpinteria, CA) 1:200, and anti-Ki-67 MIB 1 (Dako) 1:200. Sections were washed again and incubated with biotinylated secondary antibodies for 30 min followed by the streptavidin-biotin-peroxidase (Strept ABC complex/HRP Duet kit, Dako) for 30 min at room temperature. Reactions were developed with a solution containing 0.6 mg/ml of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) and 0.01% H₂O₂ and counter stained with Carazzi's haematoxylin. Positive and negative controls were included in all reactions. The intensity of the immunostaining was classified as negative, weak or strong for FAS or ErbB2 in a blinded analysis performed by two of the authors (SDS and EG). The percentage of Ki-67 positive nuclei was calculated with the aid of an image computer analyzer (Kontron 400, Carl Zeiss, Germany).

SCC-9 cells (ATCC, Manassas, VA) were plated in 8-well chamber slides (Lab Tek, Nunc, Naperville, IL) and fixed in 3.7% paraformaldehyde. Primary antibodies anti-FAS (1:3,000) and anti-cytokeratin (1:500, PAN, AE1AE3, Dako) were incubated overnight at 4°C and washed in PBS. After incubation with secondary antibodies and the streptavidin-biotin complex, the reactions were developed as described above. Immunofluorescence reactions using 3.7 % paraformaldehyde-fixed SCC-9 cells were performed with anti-ErbB2 antibodies (BD PharMingen, clone 9G6, San Diego, CA) diluted 1:50 – 1:200 in PBS 0.1% bovine serum albumin (BSA) for 1 hour at room temperature. After incubation with FITC-conjugated anti-rabbit IgG (1:500 – 1:1000; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 hour, the reactions were mounted in Vectashield with DAPI (Vector Laboratories) and documented in a Leica DMR microscope. The staining of living cells was made by incubation with the primary antibodies (1:50 – 1:200) for 1 hour at 4°C in DMEM/F12 medium containing 0.1 % BSA, followed by fixation and immersion in secondary antibody solution as described above.

Suspension-induced differentiation of SCC cells

The cell line SCC-9 was maintained in DMEM/F12 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Cultilab, Brazil), 400 ng/ml hydrocortisone and 100 μ g/ml gentamycin and kanamycin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. In order to differentiate the SCC-9 cells ⁴⁰, suspension cultures were performed according to Monk et al. (2001) ⁴¹. Briefly, serum-free methylcellulose-containing DMEM-F12 was used to keep the SCC-9 cells in suspension (1-2 x 10⁶ cells/ml of methylcellulose-DMEM-F12 medium in a 25cm² culture flask) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. After different periods of time (5-10 hours), cells were harvested by diluting the methylcellulose medium 10-fold with pre-warmed PBS and centrifuged at 1000 xg for 4 min. Differentiated SCC-9 cells were then plated (5 x 10⁴) in each well of 8-

well chamber slides (Lab Tek, Nunc). Similarly, cells grown in DMEM-F12 containing 10% FBS were plated (2×10^4 in each well) as controls. After 12-16 hours the cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde for immunocytochemistry or 90% ethanol for Papanicolaou staining. The positivity for ErbB2 at the cell membrane of differentiated and undifferentiated SCC-9 cells was analysed by immunofluorescence and flow cytometry. For the flow cytometry experiments, cells were incubated for 1 hour at room temperature with anti-ErbB2 antibodies (BD PharMingen) 1:50, washed 3 times with PBS and incubated with anti-mouse FITC conjugated at 1:250 for 1 hour. After a new washing step, analysis were carried out using a Becton Dickinson FACScan cytometer with a argon laser tuned at 488 nm (San Jose, CA). Data acquisition from 5,000 cells was performed with Consort 32 system, Lysis II software (Becton Dickinson).

Statistical analysis

For frequency analysis in contingency tables, statistical analysis of associations between variables were performed by the Fisher's exact test. Pearson correlation analyses were used to evaluate associations between FAS, ErbB2 and Ki-67 expression. Kruskal-Wallis test was used in order to compare Ki-67 expression levels in the studied samples. Significance was set for $p < 0.05$.

Results

The cytoplasmic immunohistochemical labeling for the FAS protein was weak and restricted to the lower layers of the stratum spinosum in the morphologically normal oral epithelium (Figure 1 A and 3 B). In most of the dysplastic samples (Figures 1 C and 1 D), FAS positivity was more intense than in normal tissues and widely spread to the upper epithelial cell layers. OSCC tissue samples showed strong reactions for FAS (Figures 1 E and 1 F), which were more prominent in well-differentiated OSCC than in the undifferentiated tumors (Figure 3 B). Intense FAS staining was also observed in the hyperkeratotic oral mucosa samples (Figures 1 B and 3 B), in which all cell layers, especially the stratum granulosum, were labeled. The canonical cell membrane staining for ErbB2 was clearly evident in the stratum spinosum of the normal epithelium, epithelial dysplasias, well-differentiated OSCC and hyperkeratosis (Figures 2 A, B, C and E). A diffuse cytoplasmic staining for this receptor was found at the basal cell layer of the normal epithelium, in most of the severe dysplasias and undifferentiated OSCC as well as in some areas of well-differentiated OSCC (Figures 2 A, D, E and F and 3 C and D). These results suggest that ErbB2 is concentrated at the cell membrane during keratinocyte differentiation (fact that was clearly evident in hyperkeratosis – Figure 2 B), and found in the cytoplasm of proliferating basal cells and undifferentiated neoplastic cells. In fact, the normal oral epithelial cells and cancer cells in which the keratinization process was not completely abolished were positive for ErbB2 at the cell surface. Taking in consideration all studied samples, an inverse correlation was found between the ErbB2 positivity at the cell membrane and its cytoplasmic staining ($p=0.02$, $r=-0.3$) as well as between the former and the cell proliferation index, as measured by the Ki-67 nuclear positivity ($p=0.04$, $r=-0.24$). A positive correlation was found between the Ki-67 index and the cytoplasmic ErbB2 staining ($p=0.06$, $r=0.23$). By comparing the normal oral epithelium and well-differentiated OSCC, the intensity of the FAS staining was positively correlated with the Ki-67 index ($p=0.002$, $r=0.61$) and with the cytoplasmic ErbB2 ($p=0.06$, $r=0.4$). Although not statistically significant, FAS positivity in normal epithelium and undifferentiated OSCC was also positively associated with the Ki-67 index ($p=0.09$,

$r=0.36$). Inverse correlations between the Ki-67 index and ErbB2 at the cell surface ($p=0.003$, $r=-0.59$) and between the latter and the ErbB2 cytoplasmic staining ($p=0.04$, $r=-0.43$) were observed in the same samples. When well- and undifferentiated OSCC were compared, ErbB2 at the cell membrane was positively associated with FAS staining ($p=0.03$, $r=0.41$) and inversely correlated with the ErbB2 in the cytoplasm ($p=0.04$, $r=-0.38$). A comparative analysis of the proliferative status of the oral epithelial cells showed that the Ki-67 index is progressively higher from normal oral epithelium to OSCC (Figure 3 A). Interestingly, the samples with hyperkeratosis also had a higher Ki-67 score than the normal epithelium (Figure 3 A).

The results here described indicate that an enhanced FAS production is characteristic of the malignant transformation of oral epithelial cells. It is worth noting that FAS positivity was strong in well-differentiated OSCC as well as in the hyperkeratotic oral mucosa samples. These observations suggest that the abnormally high requirement for FAS in the OSCC tissue may be superimposed to the FAS molecules committed with squamous cell differentiation, which is not abolished in well-differentiated carcinomas. In order to better understand this point, we differentiated an OSCC cell line as described by Rheinwald and Beckett (1980)⁴⁰ and Monk et al. (2001)⁴¹. Figures 4 A and B show that following anchorage- and serum-deprivation, SCC-9 cells lost their typical morphology with abundant cytoplasm and irregular shape and became small, round and eosinophilic. Keratinization was clearly evident by both Papanicolao staining (Figures 4 C and D) and immunocytochemistry (Figures 4 E and F). A finely granular FAS cytoplasmic staining was observed in undifferentiated SCC-9 cells, whereas differentiated cells showed strong positivity for FAS within large and heterogeneous granules (Figures 4 G and H). Finally, regularly growing SCC-9 cells were positive for ErbB2 both in the cytoplasm and cell membrane (Figure 5 A and B), and after the incubation in semi-solid cell culture medium the expression of this receptor was found at the surface of most differentiated cells (Figure 5 C). In order to better understand the pattern of ErbB2 positivity during keratinization we performed flow cytometry analysis, which showed an increase from 21 to 56% in the ErbB2 positive cells following anchorage-deprivation (Figure 5 D, E and F).

Discussion

In the last few years, FAS expression and activity have shown to be abnormally high in several human cancers^{2, 6-14, 42, 43} and associated with a poor prognosis in some tumors^{12, 15;16;18, 42}. Although FAS expression and activity in OSCC are also enhanced, well differentiated tumors have been described as more positive for FAS than the poorly differentiated lesions^{20, 21}. Indeed, in the present work we confirm that the production of FAS is higher in OSCC in comparison with the morphologically normal epithelium and that its immunohistochemical expression in well-differentiated tumors is stronger than in undifferentiated lesions. FAS expression in keratinized human oral epithelium has been detected in the stratum granulosum and uppermost layer of the stratum spinosum and coincides with the expression of the cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP), which is involved in the transport of long-chain fatty acids to the lamellar bodies^{44, 45}. We included in the present work sections of hyperkeratotic oral mucosa which showed, as expected, intense FAS immunostaining. Based on these observations, it is conceivable that in well-differentiated OSCC both neoplastic- and keratinization-associated FAS production are superimposed, making these samples even more positive than the undifferentiated tumors. This fact might explain why FAS expression is not more prominent in undifferentiated and aggressive OSCC, as it occurs in several cancers.

ErbB2 overexpression or gene amplification have been described in OSCC by several authors ⁴⁶⁻⁵². We have previously shown that ErbB2 is preferentially expressed at the cell membrane in well-differentiated lesions ²¹ and here we extend these results by demonstrating that ErbB2 expression at the cell surface occurs in the morphologically normal and hyperkeratotic oral epithelium, epithelial dysplasias and well-differentiated OSCC. A direct connection between the expression of this receptor and FAS was recently evidenced by Menendez et al. ^{35, 36}. According to these authors, the inhibition of FAS expression by means of RNAi or its natural specific inhibitor cerulenin down-regulates ErbB2 mRNA in breast and ovarian cancer cell lines. Moreover, the association of cerulenin with Trastuzumab (Herceptin) synergistically enhances apoptotic cell death in a breast cancer cell line. Conversely, ErbB2 overexpressing NIH-3T3 cells show high FAS protein levels and cerulenin is able to inhibit their growth in soft agar as well as to induce enhanced apoptotic cell death, in comparison with the wild type cells. In our well-differentiated OSCC cases, ErbB2 was present at the cell membrane mainly in the regions close to the keratin pearls, while poorly-differentiated OSCC expressed ErbB2 in the cytoplasm only. The positivity for ErbB2 at the cell membrane was inversely correlated to its cytoplasmic staining, which was in turn correlated with cell proliferation, as measured by the Ki-67 index. The biological significance of these distinct patterns of ErbB2 distribution is not known, however, our results suggest that when at the cell surface, this receptor has a role in squamous cell differentiation. Indeed, a statistically significant correlation was found between ErbB2 at the cell surface and FAS positivity when well-differentiated and undifferentiated tumors were compared. Some of the correlations found in the present study were weak (as demonstrated by the Spearman coefficient *r*) probably because of the number of analysed samples. Since the pattern of immunostaining observed in the tissue sections was very clear, we believe that these associations are valid, however, a larger study will be necessary to confirm these results.

OSCC-derived cell lines, such as SCC-4, -9, -15 and -25 homogeneously express FAS in the cytoplasm and their growth can be efficiently inhibited by cerulenin ¹⁹. Interestingly, in our previous work using different anti-ErbB2 primary antibodies (anti-c-erbB-2 Oncoprotein, A0485, Dako) we showed that these cells express ErbB2 mainly in the cytoplasm and epidermal growth factor receptor (EGFR), the prototype member of the ErbB family of receptors, at the cell membrane ¹⁹. Herein we observed ErbB2 positivity in both the cytoplasm and cell surface by using antibodies directed against an extracellular domain of this receptor. Anchorage deprivation by culture in methylcellulose-containing medium terminally differentiates and keratinizes SCC cells ⁴⁰. Herein we used similar culture conditions in order to promote the differentiation of SCC-9 cells and analyse the expression of FAS and ErbB2 during keratinization. Differentiated SCC-9 cells expressed FAS in cytoplasmic granular structures and had a higher frequency of ErbB2 at the cell membrane than the undifferentiated controls, corroborating the immunohistochemical results of this and previous study ²¹. The gross granular pattern of FAS expression in differentiated SCC-9 cells may represent the lipid-accumulating lamellar granules found in the stratum spinosum and granulosum of the stratified epithelium ^{53, 54}. Accordingly, the fatty acid synthesis seems to be increased during squamous cell differentiation, when short chain fatty acids are replaced by long chain saturated fatty acids ^{55, 56}.

In summary, the results here presented show that FAS expression is higher in oral hyperkeratosis, epithelial dysplasias and OSCC than in the normal oral epithelium. ErbB2 expression was observed at the cell surface of non-tumoral and well-differentiated OSCC, whereas its cytoplasmic localization was found in undifferentiated tumors. The Ki-67 index

was progressively higher from the normal oral epithelium to OSCC and positively associated with the ErbB2 cytoplasmic labeling. Finally, the *in vitro* differentiation increased the number of cell membrane ErbB2 positive cells. Taken together these findings suggest that FAS is involved in both neoplastic cell proliferation and epithelial differentiation and explain why well-differentiated OSCC express more FAS than their undifferentiated counterparts. Further studies will be necessary to elucidate the exact role of ErbB2 in the FAS gene expression in oral cancer cells.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 02/08030-1). SD Silva, Ana Lúcia CA Rangel and M Agostini are supported by FAPESP (grants 04/06398-7, 04/13904-6 and 04/06397-0).

References

- 1 Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition* 2000; 16:202-8.
- 2 Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? *J Cell Biochem* 2004; 91:47-53.
- 3 Brink J, Ludtke SJ, Yang CY, Gu ZW, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:138-43.
- 4 Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, et al. Fatty-acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions, and organ distribution of fatty-acid synthase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986; 367:905-12.
- 5 Chirala SS, Chang H, Matzuk M, et al. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:6358-63.
- 6 Pizer ES, Wood FD, Heine HS, Romantsev FE, Pasternack GR, Kuhajda FP. Inhibition of fatty acid synthesis delays disease progression in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Res* 1996; 56:1189-93.
- 7 Rossi S, Graner E, Febbo P, et al. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res* 2003; 1:707-15.
- 8 Oskouian B. Overexpression of fatty acid synthase in SKBR3 breast cancer cell line is mediated via a transcriptional mechanism. *Cancer Lett* 2000; 149:43-51.
- 9 Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, et al. The expression of fatty acid synthase (FAS) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol* 2000; 31:1068-73.
- 10 Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001; 412:822-6.
- 11 Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, et al. Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *Int J Cancer* 2002; 98:19-22.
- 12 Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, et al. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol* 2003; 30:23-8.

- 13 Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, et al. Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23:335-9.
- 14 Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2204-12.
- 15 Alo PL, Visca P, Marci A, Mangoni A, Botti C, Di Tondo U. Expression of fatty acid synthase (FAS) as a predictor of recurrence in stage I breast carcinoma patients. *Cancer* 1996; 77:474-82.
- 16 Gansler TS, Hardman W, 3rd, Hunt DA, Schaffel S, Hennigar RA. Increased expression of fatty acid synthase (OA-519) in ovarian neoplasms predicts shorter survival. *Hum Pathol* 1997; 28:686-92.
- 17 Visca P, Alo PL, Del Nonno F, et al. Immunohistochemical expression of fatty acid synthase, apoptotic-regulating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas, and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res* 1999; 5:4111-8.
- 18 Alo PL, Visca P, Framarino ML, et al. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep* 2000; 7:1383-8.
- 19 Agostini M, Silva SD, Zecchin KG, et al. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2004; 40:728-35.
- 20 Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, et al. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck* 1999; 21:325-9.
- 21 Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, et al. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol* 2004; 40:688-96.
- 22 Guo CB, Cui NH, Yu GY, Liu DX, Meng SC, Song Q. Effects of cerulenin on the endogenous fatty acid synthetic activity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61:909-12.
- 23 Furuya Y, Akimoto S, Yasuda K, Ito H. Apoptosis of androgen-independent prostate cell line induced by inhibition of fatty acid synthesis. *Anticancer Res* 1997; 17:4589-93.
- 24 Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58:4611-5.
- 25 Li JN, Gorospe M, Chrest FJ, et al. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res* 2001; 61:1493-9.
- 26 Zhang Y, Guo C, Yu G. A pilot study of fatty acid metabolism in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34:78-81.
- 27 Pizer ES, Pflug BR, Bova GS, Han WF, Udan MS, Nelson JB. Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. *Prostate* 2001; 47:102-10.
- 28 Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res* 2004; 64:2070-5.
- 29 Lacasa D, Le Liepvre X, Ferre P, Dugail I. Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression. potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. *J Biol Chem* 2001; 276:11512-6.

- 30 Swinnen JV, Heemers H, Deboel L, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G. Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. *Oncogene* 2000; 19:5173-81.
- 31 Swinnen JV, Esquenet M, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G. Androgens stimulate fatty acid synthase in the human prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res* 1997; 57:1086-90.
- 32 Heemers H, Maes B, Fougelle F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgens stimulate lipogenic gene expression in prostate cancer cells by activation of the sterol regulatory element-binding protein cleavage activating protein/sterol regulatory element-binding protein pathway. *Mol Endocrinol* 2001; 15:1817-28.
- 33 Van de Sande T, De Schrijver E, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62:642-6.
- 34 Myers RB, Oelschlager DK, Weiss HL, Frost AR, Grizzle WE. Fatty acid synthase: an early molecular marker of progression of prostatic adenocarcinoma to androgen independence. *J Urol* 2001; 165:1027-32.
- 35 Menendez JA, Vellon L, Mehmi I, et al. Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses HER2/neu (erbB-2) oncogene overexpression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:10715-20.
- 36 Menendez JA, Mehmi I, Verma VA, Teng PK, Lupu R. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase (FAS): a novel therapeutic approach for breast cancer chemoprevention through its ability to suppress Her-2/neu (erbB-2) oncogene-induced malignant transformation. *Mol Carcinog* 2004; 41:164-78.
- 37 Graner E, Tang D, Rossi S, et al. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell* 2004; 5:253-61.
- 38 Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987; 95:229-49.
- 39 Araujo CS, Graner E, Almeida OP, Sauk JJ, Coletta RD. Histomorphometric characteristics and expression of epidermal growth factor and its receptor by epithelial cells of normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontal Res* 2003; 38:237-41.
- 40 Rheinwald JG, Beckett MA. Defective terminal differentiation in culture as a consistent and selectable character of malignant human keratinocytes. *Cell* 1980; 22:629-32.
- 41 Monk SA, Denison MS, Rice RH. Transient expression of CYP1A1 in rat epithelial cells cultured in suspension. *Arch Biochem Biophys* 2001; 393:154-62.
- 42 Shurbaji MS, Kalbfleisch JH, Thurmond TS. Immunohistochemical detection of a fatty acid synthase (OA-519) as a predictor of progression of prostate cancer. *Hum Pathol* 1996; 27:917-21.
- 43 Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology* 2002; 40:71-9.
- 44 Uchiyama N, Yamamoto A, Kameda K, Yamaguchi H, Ito M. The activity of fatty acid synthase of epidermal keratinocytes is regulated in the lower stratum spinosum and the stratum basale by local inflammation rather than by circulating hormones. *J Dermatol Sci* 2000; 24:134-41.

- 45 Watanabe R, Fujii H, Yamamoto A, et al. Expression of cutaneous fatty acid-binding protein and its mRNA in rat skin. *Arch Dermatol Res* 1996; 288:481-3.
- 46 Xia W, Lau YK, Zhang HZ, et al. Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997; 3:3-9.
- 47 Xia W, Lau YK, Zhang HZ, et al. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res* 1999; 5:4164-74.
- 48 Werkmeister R, Brandt B, Joos U. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol* 2000; 36:100-5.
- 49 Bei R, Pompa G, Vitolo D, et al. Co-localization of multiple ErbB receptors in stratified epithelium of oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001; 195:343-8.
- 50 Khan AJ, King BL, Smith BD, et al. Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8:540-8.
- 51 Nagler RM, Kerner H, Laufer D, Ben-Eliezer S, Minkov I, Ben-Itzhak O. Squamous cell carcinoma of the tongue: the prevalence and prognostic roles of p53, Bcl-2, c-erbB-2 and apoptotic rate as related to clinical and pathological characteristics in a retrospective study. *Cancer Lett* 2002; 186:137-50.
- 52 Khademi B, Shirazi FM, Vasei M, et al. The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Lett* 2002; 184:223-30.
- 53 Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001:7-15.
- 54 Ricardo Martinez I, Jr., Peters A. Membrane-coating granules and membrane modifications in keratinizing epithelia. *Am J Anat* 1971; 130:93-119.
- 55 Ansari MN, Nicolaides N, Fu HC. Fatty acid composition of the living layer and stratum corneum lipids of human sole skin epidermis. *Lipids* 1970; 5:838-45.
- 56 Gray GM, Yardley HJ. Different populations of pig epidermal cells: isolation and lipid composition. *J Lipid Res* 1975; 16:441-7.