

SABRINA DANIELA DA SILVA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE ÁCIDO GRAXO SINTETASE,
ErbB2 E Ki-67 EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE
CABEÇA E PESCOÇO**

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

**PIRACICABA – SP
2004**

SABRINA DANIELA DA SILVA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE ÁCIDO GRAXO SINTETASE,
ErbB2 E Ki-67 EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE
CABEÇA E PESCOÇO**

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

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Edgard Graner
Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes

**PIRACICABA – SP
2004**

Dedico este trabalho

A Deus, essa força real que nos afaga nos difíceis momentos da vida e torna tudo possível. Pela misericórdia e amor, concede-me cada dia, tendo a graça de conviver com minha família, amigos e trabalho.

Ao meu noivo **Rodolfo**, meu presente de Deus, e a quem sou eternamente grata pela omissão de seus desejos em favor dos meus sonhos.

Aos meus pais **Natalino e Gertrudes** que na simplicidade de suas vidas e no grande amor pelos filhos, tornaram-se exemplo de dedicação e de luta.

Ao meu orientador **Professor Doutor Edgard Graner**, minha eterna gratidão por tudo que me ensinou e pelo exemplo de profissionalismo, de seriedade e simplicidade.

Ao **Doutor Luiz Paulo Kowalski** por motivar e conduzir estudos científicos sobre oncologia, meu respeito e admiração.

Agradecimentos

Agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém.

Agradecer é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente

Agradeço

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, na pessoa de seu diretor, **Professor Doutor Thales de Mattos Rocha Filho**.

Ao professor **Doutor Pablo Agustín Vargas**, coordenador do programa de Pós-graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Aos professores doutores **Edgard Graner, Heron Fernando de Souza Gonzaga, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Ricardo Della Coletta, Oslei Paes de Almeida, Osvaldo Di Hipólito Júnior e Pablo Agustín Vargas** do curso de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Aos meus queridos padrinhos que amo muito, **Mario e Tereza**, pela torcida constante por minha felicidade e sucesso.

Aos meus irmãos **Sueli, Sandro e Sidney** e seus companheiros (as) **José, Elaine e Patrícia** pelo carinho e apoio nesta etapa de minha vida.

Aos meus sobrinhos **Hugo, Mateus, Willian, Guilherme, Vinícius, Gabrielly e Danielly** por trazerem mais alegria em minha vida.

Aos meus sogros **José, Yoneko** e cunhada **Érica** que acreditaram em mim e lutaram comigo por hoje eu estar aqui. Agradeço o carinho e os incentivos dados durante toda a nossa convivência. A luta ainda não acabou! Mas já vencemos muitas batalhas!!!!

Ao professor **Doutor Alvimar Lima de Castro** que desde a graduação acompanhou meus primeiros passos.

Aos professores **Ana Maria Pires Soubhia, Renata Callestine, Marcelo Macedo Crivelini, Adriana Cristina Zavanelli, Maria Cristina Rosifini Alves Rezende, Eulália Maria Martins da Silva, Paulo Roberto Botacin** pela grande contribuição em minha vida acadêmica.

Aos colegas professores **Doutor Ricardo Della Coletta e Doutor Fábio Alves** pela ajuda na realização desse trabalho.

A funcionária do Hospital do Câncer A. C. Camargo **Inês Nobuko Nishimoto** pela realização da estatística desse trabalho.

As minhas grandes amigas **Tânia, Paulinha, Gisele, Simoni e Bia** por serem responsáveis por muitos dos momentos que me lembrarei com saudades.

Aos amigos **Osmarina e Alexandre** pelo companheirismo e incentivo.

Aos colegas da turma do mestrado **Dawton, Jorge, Juliana, Michele e Michelle**, pelos momentos de estudo e diversão.

Aos colegas da Patologia **Adhemar, Ana Carolina, Ana Lúcia, Andréia, Andresa, Bonan, Carioca, Chico, Danyel, Eduardo Campagnoli, Eduardo, Estela, Fábio Alves, Ito, Luciana, Júnior, Karininha, Karina, Lilian, Lucielma, Lucinei, Marcelo, Maranhão, Mônica, Ornellas, Paola, Patrícia, Paulo Faria e Roberto**, pela agradável convivência.

Aos funcionários da Patologia **Adriano, Ana Cristina, Cristiane, Débora, Dona Cida, Eli, João, Katiane, Rogério, Rosa e Rosinha**, pela convivência e colaboração.

E a **todas as outras pessoas** que, direta ou indiretamente, ajudaram-me ou que por algum momento me fizeram mais feliz, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos. Esse trabalho é o resultado do apoio de todos vocês!

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende".
(Leonardo da Vinci)

Lista de Abreviaturas	1
Resumo	3
Abstract	5
1. Introdução	6
2. Revisão da Literatura	10
2.1. Epidemiologia	11
2.2. Etiologia e Fatores de Risco	13
2.3. Características Clínicas e Histopatológicas	15
2.4. Ácido Graxo Sintetase (FAS)	17
2.5. Efeitos dos Inibidores de FAS	21
2.6. ErbB2	22
2.7. Receptor de andrógeno (RA)	24
2.9. Ki-67	25
3. Proposição	27
4. Materiais e Métodos	29
4.1. Amostras Estudadas	30
4.2. Análise Histopatológica	30
4.3. Reações Imunohistoquímicas	30
4.4. Análise dos Resultados	32
4.5. Análises Estatísticas	33
5. Resultados	34
5.1. Características Clínicas e Epidemiológicas da Amostra Estudada	35
5.2. Características Histopatológicas	37
5.3. Análise Imunohistoquímica	39
5.3.1. Expressão de FAS	39
5.3.2. Expressão de ErbB2	41
5.3.3. Expressão de Ki-67	43
5.4. Tipos de Tratamento Recebido pelos Pacientes	44
5.5. Presença de Recorrências Locais e Metástases	45
5.6. Situação Clínica do Paciente até a Data da Última Informação Obtida	46
5.7. Correlações de Frequência	47
5.8. Tempo de Sobrevida Global	49
5.9. Tempo de Sobrevida Livre de Doença	53
6. Discussão	57
7. Conclusões	64
8. Referências Bibliográficas	66
Anexos	86

Lista de Abreviaturas

ADH – Álcool desidrogenase

ALDH – Aldeído desidrogenase

BSA – “Bovine serum albumin” - Albumina sérica bovina

°C - Graus Celsius

cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar

CEC – Carcinoma espinocelular

DAB - Diaminobenzidina

DMSO – Dimetil sulfóxido

EGF – “Epidermal growth factor” - Fator de crescimento epidérmico

EGFR – “Epidermal growth factor Receptor” - Receptor do fator de crescimento epidérmico

FAS – “Fatty acid synthase” – Ácido graxo sintetase

INCA – Instituto Nacional do Câncer

kDa – Quilodaltons

LHRH – “Luteinizing hormone releasing hormone” - Fator liberador do hormônio luteinizante

mM - Milimolar

ml - Mililitros

mM - Milimolar

NADPH – “Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate” - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

nM - Nanomolar

PBS – “Phosphate Bufferes Saline” - Solução salina tamponada com fosfato

PCNA – “Proliferating Cell Nuclear Antigen” - Antígeno nuclear de proliferação celular

PI-3K – “Phosphatidylinositol-3- kinase” - Fosfoinositídeo-3-quinase

RA - Receptor de Andrógeno

RNA -Ácido ribonucléico

SCC – “Squamous cell carcinoma”

SNC – Sistema nervoso central

SRE - “Sterol regulatory element” - Elemento regulatório de esteróide

SREBP - “Sterol regulatory element binding protein” - Proteína ligante do elemento regulatório de esteróide

μM - Micromolar

Resumo

A enzima ácido graxo sintetase (FAS) tem um papel central na biossíntese de ácidos graxos a partir dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA. 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. Vários trabalhos recentes têm demonstrado que a expressão de FAS é elevada em neoplasias malignas como as de próstata, mama, ovário, bexiga, endométrio, tireóide, esôfago, estômago, pulmão, melanoma e sarcomas de partes moles. Apenas um estudo imunohistoquímico realizado em carcinomas espinocelulares (CEC) bucais descreve a produção de FAS neste tipo de neoplasia, sugerindo que a produção desta enzima possa ser indicadora das etapas iniciais de transformação maligna. ErbB2, um receptor da família ErbB, é capaz de aumentar a expressão de FAS em uma linhagem celular derivada da glândula mamária, a qual se torna então sensível ao tratamento com bloqueadores da atividade de FAS, entrando em apoptose. Como ainda não existem na literatura marcadores moleculares com aplicabilidade clínica para se estimar agressividade e determinar prognóstico dos CECs de cabeça e pescoço, este trabalho teve como objetivo avaliar, através de reações imunohistoquímicas, a expressão de FAS, ErbB2 e de Ki-67 em amostras desta neoplasia. Positividade citoplasmática para FAS foi intensa nas lesões histologicamente bem diferenciadas, enquanto que ErbB2 exibiu dois padrões bastante distintos de marcação, um localizado na membrana plasmática e o outro intra-citoplasmático. Uma alta porcentagem (81,25%) das células fortemente positiva para FAS foi também intensamente marcada para ErbB2, com correlação positiva estatisticamente significativa ($p = 0,01$). A positividade para ErbB2 foi correlacionada com o grau histológico dos tumores, sendo as áreas bem diferenciadas mais fortemente marcadas na membrana plasmática. Entretanto, nas áreas menos diferenciadas, com maior pleomorfismo celular, a expressão citoplasmática de ErbB2 foi mais evidente.

Todos os casos da amostra estudada mostraram positividade nuclear para o antígeno de proliferação Ki-67, sendo as lesões com maior índice de marcação associadas a uma sobrevida global mais curta ($p=0,03$). 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 Ki-67 se mostrou um marcador molecular para o prognóstico destas lesões.

Abstract

Fatty acid synthase (FAS) is a key metabolic enzyme responsible for the biosynthesis of saturated fatty acids using acetyl-CoA and malonyl CoA as substrates. FAS has specialized physiologic functions that include the storage of lipids in adipose tissue, production of milk lipids in the lactating breast tissue and synthesis of cell membranes. Overexpression of FAS has been reported in several human malignancies, such as prostate, breast, ovarian, bladder, endometrium, thyroid, esophagus, stomach, lung, melanoma and soft tissue sarcomas. There is only one immunohistochemical study with oral squamous cell carcinoma (SCC) samples suggesting that the expression of FAS is increased at the early stages of malignant transformation. ErbB2, a transmembrane tyrosine kinase member of the ErbB receptor family, is able to increase the expression of FAS in a breast epithelial cell line, which becomes susceptible to apoptosis by FAS inhibition. Herein we analyzed by immunohistochemistry the expression of FAS, ErbB2, and the proliferation marker Ki-67 in 62 head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) samples. FAS positivity was cytoplasmic and the strongest reactions were found in well differentiated tumors. 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 (81,25%) that showed a high expression of FAS were also positive for ErbB2 ($p=0.01$). The immunolabeling for ErbB2 at the cell membrane was also stronger in histologically well differentiated lesions while cytoplasmic positivity was found in undifferentiated tumors. All the cases of the studied sample showed nuclear expression of Ki-67, which was significantly associated with a poor prognosis ($p=0.03$). Taken together, the results presented here show that FAS and ErbB2 are co-expressed in HNSCC and suggest that ErbB2 regulates FAS expression in these tumors. Moreover, our data point out Ki-67 as a useful prognostic marker for HNSCC.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

Cresce rapidamente a quantidade de informações sobre a biologia do câncer, um conjunto de doenças distintas com causas, cursos clínicos e formas de tratamento diferentes. Atualmente, os países desenvolvidos já têm maior controle sobre as doenças de origem infecciosa, o que faz do câncer um problema comum e centro de grande atenção científica.

Os carcinomas são neoplasias malignas de origem epitelial caracterizadas por 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 a 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 uma enfermidade de causa multifatorial (Llewellyn *et al.*, 2001). Não há um carcinógeno isolado, mas fatores intrínsecos e extrínsecos que, em conjunto, causam a transformação maligna do epitélio escamoso queratinizado ou não queratinizado que reveste a cavidade bucal (Neville *et al.*, 1998).

No Brasil, o câncer representa a segunda causa de morte por doença e o CEC em boca está entre os seis tipos de câncer que mais acometem os homens, sendo o oitavo mais comum nas mulheres (Moore *et al.*, 1999; Ministério da Saúde, 2003). Os indivíduos portadores dessa entidade são geralmente homens acima de 40 anos de idade e o local mais acometido é a borda lateral de língua, seguida pelo lábio inferior (Zakrzewska, 1999; Coletta *et al.*, 2002; Kowalski *et al.*, 2003).

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 dos tratamentos. A FAS é uma enzima envolvida na síntese de ácidos graxos saturados de cadeias longas usando acetil-CoA e malonil-CoA como substratos (Kuhajda, 2000; Baron *et al.*,

2003). Em condições fisiológicas FAS participa do armazenamento de energia, da produção de ácidos graxos durante a lactação e da síntese de membranas celulares (Kuhajda, 2000; Swinnen *et al.*, 2003). A expressão de FAS tem sido recentemente descrita como elevada em neoplasias malignas, como as de colon (Rashid *et al.*, 1997; Visca *et al.*, 1999), próstata (Shurbaji *et al.*, 1992; Epstein *et al.*, 1995; Swinnen *et al.*, 1997; Kuhajda, 2000; Dhanasekaran *et al.*, 2001; Welsh *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2001; Swinnen *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003), mama (Chalbos *et al.*, 1990; Pizer *et al.*, 1996a; Milgraum *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 2000; Oskouian *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001), ovário (Pizer *et al.*, 1996b; Alo *et al.*, 2000), endométrio (Pizer *et al.*, 1998a), pulmão (Piythilake *et al.*, 2000), bexiga (Visca *et al.*, 2003), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), tireóide (Vlad *et al.*, 1999), mesoteliomas (Gabrielson *et al.*, 2001), melanomas (Innocenzi *et al.*, 2003) e sarcomas (Takahiro *et al.*, 2003). Apenas um estudo imunohistoquímico realizado em CECs bucais sugere que o aumento da produção desta enzima pode ser indicador das etapas iniciais de transformação maligna (Krontiras *et al.*, 1999). Assim, a expressão diferencial de FAS entre tecidos normais e tumorais a torna um alvo terapêutico em potencial (Kuhajda, 2000; Kuhajda *et al.*, 2000; Gabrielson *et al.*, 2001).

ErbB2 é um receptor transmembrânico membro da família ErbB com atividade de tirosina-quinase, envolvido na regulação do crescimento e diferenciação celular (O-charoenrat *et al.*, 2002; Holbro *et al.*, 2003). Alguns autores encontraram uma expressão anormalmente alta deste receptor na superfície das células de diversos tumores, particularmente os de mama, nos quais ErbB2 tem sido usado como marcador prognóstico e como alvo molecular para o tratamento (Slamon, 1987; Albanell, 1996; Yarden, 2001). ErbB2 foi recentemente descrito como sendo capaz de estimular a expressão da enzima FAS em células epiteliais da glândula mamária em cultura (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Considerando-se a expressão de ErbB2 em CECs bucais parece estar aumentada (Hou *et al.*, 1992; Werkmeister *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1999; Bei *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002), este pode também estar envolvido na

ativação das vias intracelulares que controlam a expressão do gene que codifica FAS nos CECs bucais.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar, através de reações imunohistoquímicas, a expressão de FAS, ErbB2 e do marcador de proliferação celular Ki-67 em CECs de cabeça e pescoço de pacientes tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Correlação entre a positividade para estas proteínas e os dados clínicos e histopatológicos de cada paciente são estudadas através dos testes qui-quadrado, teste exato de Fisher e método de Kaplan-Meier.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. Revisão da Literatura

2.1. Epidemiologia

A “American Cancer Society” estimou, em 1993, 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 os países desenvolvidos como aqueles em desenvolvimento (Moore *et al.*, 1999; Wünsch-Filho, 2002). Estima-se que o CEC bucal seja o sexto tipo mais comum de câncer no mundo e o mais comum na Índia (Boyle *et al.*, 1990; Zakrzewska, 1999; Moore *et al.*, 1999; Llewellyn *et al.*, 2001).

O Ministério da Saúde estima para 2003, em todo o Brasil, 402.190 novos casos e 126.960 óbitos por câncer. Para o sexo masculino, são esperados 186.155 casos novos e 68.350 óbitos, enquanto que, para o sexo feminino, são estimados 216.035 casos novos e 58.610 óbitos (Tabela 1). O principal tipo de câncer na população brasileira será o de pele não melanoma, seguido pelas neoplasias da mama, próstata, pulmão e estômago. Nos homens, o câncer de pele não melanoma também será o mais freqüente seguido pelos de próstata, pulmão, estômago e cólon e reto. Nas mulheres, destacar-se-ão os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e estômago (Ministério da Saúde, 2003).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CEC representa cerca de 95% de todos os tumores malignos da boca (Ministério da Saúde, 2003). No Brasil, a incidência de CECs da cavidade bucal em homens da cidade de São Paulo está 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 (Tabela 1). Os indivíduos portadores dessa entidade são com maior freqüência homens acima de 40 anos de idade (Zakrzewska, 1999; Coletta *et al.*, 2002; Kowalski *et al.*, 2003) e a região

anatômica mais afetada é o lábio inferior, seguido pela borda lateral de língua e assoalho bucal (Coletta *et al.*, 2002; Kowalski *et al.*, 2003).

A incidência do CEC em orofaringe é maior em homens do que em mulheres (4:1), ocorrendo principalmente na quinta ou sexta décadas de vida (Kowalski *et al.*, 2003). No município de São Paulo há uma das maiores incidências mundiais de CEC de laringe, sendo de 14,9/100.000 em homens e 5,1/100.000 em mulheres, numa proporção de 10:1 (Mirra *et al.*, 2001). No Brasil, a maioria dos tumores são transglóticos no momento do diagnóstico, seguindo-se em ordem decrescente os glóticos, supraglóticos e subglóticos (Kowalski *et al.*, 2003).

Um fato que piora o prognóstico do câncer é o diagnóstico tardio. 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 estágios avançados, quando a lesão é destrutiva e infiltrativa, os linfonodos palpáveis e o prognóstico invariavelmente sombrio (Ministério da Saúde, 2003). 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 no aparelho estomatognático (Lopes *et al.*, 1998; Kowalski *et al.*, 2003).

Tabela 1: Estimativas para o ano 2003 do número de casos novos e de óbitos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária, no Brasil.

Localização Primária	Estimativa de casos novos			Estimativa de óbitos		
	Masculino	Feminino	Total	Masculino	Feminino	Total
Pele não Melanoma	39.000	43.155	82.155	510	365	875
Mama Feminina	-	41.610	41.610	-	9.335	9.335
Traquéia, Brônquio e Pulmão	15.165	6.920	22.085	11.315	4.915	16.230
Estômago	13.630	7.010	20.640	7.330	3.815	11.145
Colo de útero	-	16.480	16.480	-	4.110	4.110
Próstata	35.240	-	35.240	8.230	-	8.230
Cólon e Reto	9.530	10.545	20.075	3.700	4.270	7.970
Esôfago	6.775	2.120	8.895	4.320	1.275	5.595
Leucemias	4.065	3.315	7.380	2.510	2.095	4.605
Cavidade Oral	7.750	2.885	10.635	2.540	705	3.245
Pele Melanona	2.185	2.185	4.370	645	480	1.125
Outras Localizações	52.815	79.810	132.625	27.250	27.245	54.495
Total	186.155	216.035	402.190	68.350	58.610	126.960

Fonte: Ministério da Saúde, 2003.

2.2. Etiologia e Fatores de Risco

O desenvolvimento do câncer está associado ao acúmulo de alterações genômicas, particularmente nos genes que regulam o crescimento, a diferenciação e a morte celular, a estabilidade e o reparo do DNA e a imunidade celular ou humoral (Scully, 1993; Line *et al.*, 1995; Scully *et al.*, 2000; Coletta *et al.*, 2002). 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).

O risco para o CEC de boca está associado a fatores ambientais, dentre os quais se destacam o consumo de tabaco e álcool (Franco *et al.*, 1989; Smith, 1989; Johnson & Warnakulasuriya, 1993; Andre *et al.*, 1995; Macfarlane *et al.*,

1996; Zakrzewska, 1999; Schlecht *et al.*, 1999), além da radiação actínica nos casos de CEC de lábio inferior (Line *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1999). 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). Entre as substâncias potencialmente mutagênicas do tabaco encontram-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nitrosaminas, aldeídos e aminas aromáticas (Znaor *et al.*, 2003). O mecanismo pelo qual o álcool atua nas células epiteliais ainda é incerto. Embora o etanol por si só não seja mutagênico, os produtos de seu metabolismo, principalmente os acetaldeídos, são produtores de radicais livres e causam mutações no DNA (Macfarlane *et al.*, 1996). Para o metabolismo do álcool são necessárias duas enzimas presentes no fígado e na mucosa do trato digestivo superior, incluindo a cavidade bucal. A primeira delas é a álcool desidrogenase (ADH), que oxida o etanol gerando acetaldeído, o qual é transformado em água e gás carbônico, inócuos para as células, pela aldeído desidrogenase (ALDH). Assim, se as células apresentarem deficiências na atividade de ALDH ou forem submetidas a doses de álcool superiores a sua capacidade de metabolismo, pode ocorrer um acúmulo do acetaldeído e aumento do risco de mutações (Macfarlane *et al.*, 1996). Neste contexto, polimorfismos no gene que codifica a enzima ADH3, um dos subtipos de ADH, foram recentemente relatados como um potencial fator de risco para carcinomas das vias aerodigestivas superiores, principalmente em um grupo de pacientes com baixo consumo relativo de álcool e tabaco (Nishimoto *et al.*, 2004).

A radiação solar, particularmente os raios ultravioletas, é a principal causa dos cânceres de pele e do CEC de lábio inferior, estando provavelmente associada à formação dos dímeros de pirimidina pela ligação covalente entre duas bases pirimidicas adjacentes no DNA (Line *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1999). Associações etiológicas com outros fatores externos, como a sífilis, infecção por HPV e estado sistêmico do paciente também tem sido sugeridas (Walker *et al.*,

2003). A radiação X pode causar neoplasias malignas (sarcomas ou carcinomas) como efeito colateral após tratamentos radioterápicos (Onodera *et al.*, 1998). Estudos moleculares tem detectado o DNA de vírus HPV em amostras de CEC bucal, entretanto sua relação com a etiologia deste tumor não foi ainda estabelecida (Neville *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 2003). A exposição profissional a fibras têxteis, metais, couro, níquel, álcool isopropílico e ácido sulfúrico parecem também aumentar o risco para o CEC de boca (Kowalski *et al.*, 2003).

O CEC da orofaringe apresenta características semelhantes ao CEC da cavidade bucal, tendo como principal fator de risco o tabagismo potencializado pelo etilismo. Da mesma forma, o consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas são os principais fatores de risco para o carcinoma de laringe. Algumas exposições profissionais, como ao níquel ou asbestos, bem como o trabalho em indústrias têxteis parecem estar relacionados a um aumento na taxa de risco para o câncer na laringe (Kowalski *et al.*, 2003).

2.3. Características Clínicas e Histopatológicas

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 e emagrecimento (Neville *et al.*, 1998; Zakrzewska, 1999; Kowalski *et al.*, 2003). As lesões ocorrem mais comumente no gênero masculino, predominando na sexta e sétima décadas de vida (Moore *et al.*, 1999; 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). Outros locais são também afetados, como gengiva, rebordo alveolar, palato mole e mucosa jugal, porém,

com menor frequência. O CEC de lábio inferior representa cerca de 30% dos cânceres de boca, sendo importante em países tropicais como o Brasil, no qual grande número de trabalhadores rurais ficam expostos por tempo prolongado à radiação actínica (Ministério da Saúde, 2003).

O carcinoma de orofaringe pode ser, quando no início, assintomático ou apresentar algum desconforto mínimo durante a deglutição. Otalgia, odinofagia, disfagia, trismo ou metástases cervicais são outros sinais clínicos importantes. A disfagia e a otalgia são sintomas preponderantes, freqüentemente acompanhados de linfonodos cervicais metastáticos. O trismo, nas lesões da parede lateral da orofaringe ou loja amigdaliana, ou perda de mobilidade da língua, nas lesões de base de língua, são sugestivas de infiltração do carcinoma para planos musculares profundos. O CEC de laringe pode ser dividido em lesões da supraglote, glote e subglote. Os tumores glóticos causam rouquidão persistente, os subglóticos produzem dispnéia, enquanto que os supraglóticos geralmente se caracterizam por odinofagia. Outros sintomas associados aos tumores mais avançados são disfagia, tosse, otalgia reflexa, hemoptise e linfonodos metastáticos (Kowalski *et al.*, 2003).

Do ponto de vista microscópico, as lesões de CEC da região de cabeça e pescoço apresentam-se como proliferações de células espinhosas 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. Segundo a diferenciação celular, os CECs são classificados em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e indiferenciados, de acordo com os graus 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 queratinização de células individuais possa ser observada. As lesões indiferenciadas 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).

O CEC bucal pode apresentar cinco variantes raras, com características clínicas, histológicas e de comportamento bastante peculiares: carcinoma de células fusiformes, carcinoma verrucoso, carcinoma papilífero, carcinoma adenoescamoso e carcinoma basalóide escamoso (Cotrim *et al.*, 2002).

2.4. Ácido graxo sintetase (FAS)

FAS é uma enzima multifuncional com um papel central na síntese 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 consiste em um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas idênticas, com aproximadamente 250 a 270 kDa cada, contendo sete sítios catalíticos organizados em seqüência (Wakil, 1989; Brink *et al.*, 2002).

Para a produção de ácidos graxos é necessária também a atividade das enzimas acetil-CoA carboxilase, que sintetiza malonil-CoA, citrato liase, que sintetiza acetil-CoA, enzima málica e via da pentose fosfato, que produzem NADPH, molécula usada como agente redutor na síntese de ácidos graxos. 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

(Kuhajda, 2000; Pizer *et al.*, 2000), além de miristato e estereato (Chirala *et al.*, 2003).

Em condições normais, a síntese endógena de ácidos graxos é mínima, exceto em tecidos lipogênicos, como o tecido adiposo e o fígado, pois, a maioria das células humanas normais utiliza os lipídios provenientes 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 (Kuhajda, 2000; Chirala *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003) e fornecimento de energia pela oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias (Baron *et al.*, 2004).

FAS é altamente expressa no endométrio durante a fase de proliferação, provavelmente devido ao intenso crescimento celular neste tecido (Pizer *et al.*, 1998a). Em neoplasias malignas, a síntese de ácidos graxos ocorre de forma independente do suplemento nutricional (Weiss *et al.*, 1986). Recentemente, muitos autores têm demonstrado que as células de neoplasias malignas e também algumas lesões cancerizáveis expressam níveis anormalmente altos de FAS, como nos carcinomas de colon (Rashid *et al.*, 1997; Visca *et al.*, 1999), próstata (Shurbaji *et al.*, 1992; Epstein *et al.*, 1995; Swinnen *et al.*, 1997; Kuhajda *et al.*, 2000; Dhanasekaran *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2001; Welsh *et al.*, 2001; Swinnen *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003), mama (Chalbos *et al.*, 1990; Pizer *et al.*, 1996a; Milgraum *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 2000; Oskouian *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001), ovário (Pizer *et al.*, 1996b; Alo *et al.*, 2000), endométrio (Pizer *et al.*, 1998a), pulmão (Piythilake *et al.*, 2000), bexiga (Visca *et al.*, 2003), esôfago (Nemoto *et al.*, 2001), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), tireóide (Vlad *et al.*, 1999), mesoteliomas (Gabrielson *et al.*, 2001), melanomas (Innocenzi *et al.*, 2003) e sarcomas dos tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003). Além do mais, para alguns tumores, como os de próstata (Shurbaji *et al.*, 1996; Epstein *et al.*, 1995), mama (Alo *et al.*, 1996), ovário (Gansler *et al.*, 1997; Alo *et al.*, 2000) tireóide (Vlad *et al.*, 1999), colon (Visca *et al.*, 1999) melanomas (Innocenzi *et al.*, 2003) e sarcomas

de tecidos moles (Takahiro et al., 2003) uma associação positiva entre a expressão da proteína FAS e um comportamento clínico agressivo tem sido descrita.

Com relação aos CECs intrabuciais, há um único estudo imunohistoquímico realizado em lesões de língua, que mostrou uma expressão maior de FAS em áreas de displasia epitelial moderada e de CEC, quando comparadas ao epitélio bucal normal. Estes autores sugeriram, baseados nestes achados, que o aumento na produção de FAS poderia ser indicador das etapas iniciais da transformação maligna e da diferenciação das células neoplásicas, pois, nesta casuística, os CECs bem diferenciados expressaram mais FAS do que os indiferenciados (Krontiras et al., 1999).

Foi recentemente 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 possam apresentar potencial teratogênico.

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 biológico que conecta estes dois sistemas (ciclo celular e síntese de ácidos graxos) ainda não é conhecido. Swinnen et al. (2003) demonstraram que a expressão e atividade de FAS são necessárias para a produção de fosfolípidios da membrana celular em células de câncer de próstata (LNCaP), o que sugere que FAS tenha um papel essencial na síntese das membranas celulares de células tumorais.

O mecanismo que rege a produção de FAS nas células tumorais não está totalmente esclarecido. Estudos demonstram que esta regulação pode ocorrer através 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). Nas células LNCaP, a expressão de FAS é aumentada tanto por andrógenos como pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) (Swinnen *et al.*, 1997; Swinnen *et al.*, 2000), ao passo que na linhagem celular MCF7, derivada de câncer de mama, a produção de FAS é estimulada por progesterona (Lacasa *et al.*, 2001). Em um trabalho recente utilizando a tecnologia dos “microarrays” de cDNA, Kumar-Sinha *et al.* (2003) identificaram um grupo de genes que são diferencialmente regulados por ErbB2, através da indução forçada da sua expressão em células epiteliais de mama em cultura. Um dos genes descobertos como sendo regulado pelo ErbB2 é o que codifica a FAS e, segundo estes autores, a inibição da atividade da FAS causa apoptose preferencialmente nas células que estão expressando ErbB2 em grandes quantidades. Este trabalho mostra, pela primeira vez, uma conexão entre ErbB2 e FAS, sendo esta mediada pela via PI-3K através do efeito direto no promotor de FAS.

A transcrição de genes que codificam enzimas lipogênicas, como aquelas envolvidas na manutenção da homeostase do colesterol e do controle da síntese e ácidos graxos, é ativada por proteínas ligadoras aos elementos reguladores de esteróides (SREBP). As SREBPs formam uma família de fatores de transcrição que estimula a transcrição de genes que contém em suas regiões regulatórias os elementos SRE (Brown & Goldstein, 1997; Swinnen *et al.*, 1997; Brown & Goldstein, 1999; Swinnen *et al.*, 2000; Heemers *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003). A ativação da via PI3K, em células LNCaP, aumenta a transcrição do gene que codifica FAS devido ativação de SREBP por andrógenos ou EGF (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). Da mesma maneira, em células

epiteliais de mama, ErbB2 estimula o promotor de FAS através da via PI3K, provocando um aumento da síntese de ácidos graxos (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). 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.*, 2004). De fato, foi demonstrado que a quantidade da proteína FAS pode ser regulada em células LNCaP pelo sistema ubiquitina-proteossomo, através do controle da ligação covalente de moléculas de ubiquitina a FAS (Graner *et al.*, 2003). Estes resultados todos mostram que o controle de FAS é muito complexo e que mais estudos são ainda necessários para o seu entendimento nos processos fisiológicos ou patológicos.

2.5. Efeitos dos inibidores de FAS

A alta expressão de FAS em tecidos tumorais sugere que esta enzima possa ser um alvo quimioterápico em potencial. A cerulenina, um produto natural do fungo “*cefalosporium caerulens*”, é conhecida desde 1960 como um inibidor específico da síntese de ácidos graxos de amplo espectro filogenético. Esta droga inibe irreversivelmente a atividade da enzima FAS através de sua ligação covalente no sítio da β -cetoacil sintetase, responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (Pizer *et al.*, 1998b, Kuhajda *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2003). c75 é uma pequena molécula sintética com cadeia de 7 carbonos que possui efeitos inibitórios sobre a atividade de FAS comparáveis aos da cerulenina, sendo mais estável do que esta e apresentando portanto melhor efeito “in vivo” (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

Tanto a cerulenina como c75 produzem uma rápida e significativa inibição da replicação do DNA e, conseqüentemente, da progressão da fase S do ciclo celular em células derivadas de neoplasias malignas humanas (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1996a; Pizer *et al.*, 1998b; Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; De Schrijver *et al.*, 2003), o que culmina com a morte por apoptose (Pizer *et al.*,

1996a, Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Thupari *et al.*, 2001). Entretanto, o mecanismo exato pelo qual a inibição de FAS desencadeia a apoptose não está totalmente elucidado. Zhou *et al.* (2003) demonstraram que c75, utilizado em células tumorais de mama (MCF-7), aumentou a oxidação de fosfolipídios de membrana ao mesmo tempo em que inibiu a síntese dos mesmos, provocando acúmulo de malonil-CoA. Segundo estes e outros autores (Pizer *et al.*, 1998b; Pizer *et al.*, 2000; Thupari *et al.*, 2001), o acúmulo deste intermediário metabólico induz a morte celular por apoptose. Além de seus efeitos sobre o ciclo celular, inibidores químicos da atividade de FAS são aparentemente bem tolerados em camundongos adultos, nos quais agem como inibidores de apetite de ação no SNC (Loftus *et al.*, 2000).

2.6. ErbB2

A família ErbB de receptores transmembrânicos é composta por quatro membros, a saber, EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 e ErbB4/HER4 (O-charoenrat *et al.*, 2002; Holbro *et al.*, 2003). Apesar do ligante de ErbB2 não ter sido ainda identificado, este receptor é capaz de se dimerizar com outros receptores desta família, como o EGFR (Penuel *et al.*, 2001; O-charoenrat *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001), formando heterodímeros capazes de causar intensa e prolongada ativação das vias de sinalização intracelular (Holbro *et al.*, 2003). Desta forma, ErbB2 é ativado por EGF, através da formação de heterodímeros entre ErbB1 e ErbB2, ou pela heregulina, através da heterodimerização com ErbB3 ou ErbB4 (Graus-Porta *et al.*, 1997; Magnifico *et al.*, 1998). Uma vez que esses receptores são ativados, ocorre auto-fosforilação e fosforilação cruzada, desencadeando uma cascata de reações (através das vias MAPK ou PI3K) que resulta em fosforilação de fatores de transcrição que controlam diversos processos celulares (Yarden, 2001; Holbro *et al.*, 2003).

Todos os receptores da família ErbB2 estão envolvidos na regulação do crescimento, diferenciação ou migração celular (O-charoenrat *et al.*, 2002). Células tumorais podem apresentar ativação constante dos receptores ErbB2 e EGFR, seja por amplificação gênica, mutações ou deleções nos domínios intra e extracelulares, ou mesmo por um aumento na sua expressão, o que causa a perpetuação dos sinais que estimulam a divisão celular (O-charoenrat *et al.*, 2000; Penuel *et al.*, 2001; O-charoenrat *et al.*, 2002; Holbro *et al.*, 2003).

ErbB2 é um dos mais bem caracterizados oncogenes no desenvolvimento do câncer de mama, sendo altamente expresso em cerca de 30% dos tumores (Isola *et al.*, 1999). A expressão aumentada de ErbB2 nestes tumores tem sido positivamente associada a um pior prognóstico, ou seja, menor tempo livre da doença e menor sobrevida total do paciente após o tratamento (Slamon *et al.*, 1987; Albanell *et al.*, 1996; Khademi *et al.*, 2002). Um anticorpo monoclonal humanizado contra ErbB2 (Herceptin) tem se mostrado eficiente no tratamento dos casos de câncer de mama que expressam grandes quantidades de ErbB2, causando regressão tumoral em cerca de 20% destes tumores (Baselga *et al.*, 1996; Yarden, 2001).

Existem relatos na literatura descrevendo a amplificação do gene que codifica ErbB2 em CECs da região de 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). Da mesma forma, níveis aumentados da proteína ErbB2 têm sido encontrados em vários estudos com CECs bucais, sugerindo fortemente que esta proteína possa ter algum papel na patogênese desta neoplasia (Hou *et al.*, 1992; Werkmeister *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1999; Bei *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002).

Como descrito no item 2.4 deste capítulo, um estudo recente (Kumar-Sinha *et al.*, 2003) evidenciou um aumento da expressão do gene que codifica FAS em uma linhagem celular derivada de glândula mamária, após a expressão forçada e estável de grandes quantidades de ErbB2. Levando-se em consideração os

indícios da participação de ErbB2 na etiologia do CEC da região de cabeça e pescoço e as evidências de um papel para FAS na patogênese de neoplasias malignas, um dos objetivos do presente trabalho é verificar uma possível correlação entre a expressão do oncogene ErbB2 e de FAS em amostras destes tumores.

2.7. Receptor de andrógeno (RA)

RA é um fator de transcrição, pertencente à família dos receptores hormonais esteroidais, que regula a expressão dos genes necessários para o desenvolvimento sexual masculino, manutenção da função dos órgãos sexuais, bem como desempenha papel importante na função do tecido muscular, folículos pilosos e cérebro (Culig *et al.*, 2002). Anormalidades nas vias de sinalização através do RA têm sido relacionadas com infertilidade masculina e com o desenvolvimento de câncer de próstata (Lee & Chang, 2003).

O crescimento do carcinoma de próstata é regulado por interações complexas entre esteróides, fatores de crescimento peptídicos e citocinas, ocorrendo um grande desajuste nestas moléculas e nos seus receptores principalmente nas fases tardias do tumor (Culig *et al.*, 2002). Huggins & Hodges foram os primeiros a reconhecer a dependência hormonal do câncer de próstata em 1941 (Culig *et al.*, 2002). Estes autores mostraram que com a remoção de andrógeno ocorria regressão do tumor, sendo esta descoberta a base da terapia atual para tumores metastáticos avançados. Como a maioria das células do câncer de próstata depende de andrógeno para sua manutenção, o objetivo da terapia é privá-las do hormônio, e isso é alcançado através de orquiectomia ou pela administração de drogas anti-androgênicas que atuem bloqueando a síntese do hormônio masculino ou bloqueando a ação da testosterona junto à célula alvo. As drogas anti-androgênicas podem ser não esteroidais, como o Eulexin® (flutamida), Casodex® (bicalutamida) e Anandron® (nilutamida), que apenas

bloqueiam a ação da testosterona, ou esteroidais como Androcur® (ciproterona), que bloqueia o efeito hormonal e ao mesmo tempo inibe a síntese de testosterona (Anderson, 2003; Cifuentes *et al.*, 2004). Além das drogas anti-androgênicas há os análogos do fator liberador do hormônio luteinizante (LHRH), como o Lupron® (acetato de leuprolina), Zoladex® (acetato de goserelina), Suprefact® (acetato de buserelin) e Neo-decapeptil® (triptorelina), que agem diretamente no eixo hipotálamo-hipófise impedindo a síntese da testosterona, atingindo níveis semelhantes aos da orquiectomia cirúrgica. Embora a terapia anti-androgênica induza a remissões, a progressão do tumor leva ao aparecimento de clones insensíveis à testosterona, os quais, segundo Lin *et al.* (2001) são estimulados por ErbB2.

A literatura é bastante escassa e controversa em relação à expressão de RA em neoplasias bucais. Ojanotko-Harri *et al.* (1992) mostraram, através de reações imunohistoquímicas em amostras de mucosa oral saudável, que a positividade nuclear foi mais intensa na camada basal do epitélio, nas células endoteliais e nos fibroblastos. Bassalyk *et al.* (1987) demonstraram que a expressão de RA em CECs bucais é maior do que nas leucoplasias, enquanto que Nehse & Tunn (1994) descreveram níveis mais baixos de RA em amostras de CECs de assoalho bucal e língua do que na mucosa bucal normal.

2.8. Ki-67

O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear expressa preferencialmente durante as fases S e G₂ do ciclo celular (Sittel *et al.*, 1999). Somente as células em proliferação expressam Ki-67, ao contrário das células quiescentes (G₀), que não produzem esta proteína (Gerdes *et al.*, 1984). Anticorpos contra Ki-67 têm mostrado grande valor em estudos de biologia tumoral, pois parecem marcar especificamente a fração proliferativa dos tecidos normais e neoplásicos. Apesar de bastante utilizado como marcador de proliferação celular, a função biológica da

proteína Ki-67 ainda não é conhecida (Sholzen & Gerdes, 2000), porém, a sua inibição específica com oligonucleotídeos anti-sense é capaz de bloquear a síntese de DNA (Schluter *et al.*, 1993).

Alguns autores sugerem a utilização deste antígeno como um marcador molecular para o estabelecimento do prognóstico de diversas neoplasias malignas. Entretanto, assim como para todos os marcadores biológicos estudados até o momento, os resultados são muitas vezes controversos. Por exemplo, em sarcomas de partes moles o índice de positividade para Ki-67 parece ser importante para predizer o tempo de sobrevida dos pacientes e a chance de ocorrerem metástases à distância (Ueda *et al.*, 1989; Rudolph *et al.*, 1997; Heslin *et al.*, 1998). O mesmo parece ser verdadeiro para o adenocarcinoma de próstata e de mama (Sholzen & Gerdes, 2000), pulmão (Takahashi *et al.*, 2002), bexiga (Bozlu *et al.*, 2002), laringe (Wozniak *et al.*, 2002), rim (Tejido Sanchez *et al.*, 2002) e tumores de cabeça e pescoço (Sittel *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

3. Objetivos

O propósito deste trabalho foi:

1. Avaliar, através de reações imunohistoquímicas, a expressão de FAS, ErbB2, RA e de Ki-67, em amostras de CECs da região de cabeça e pescoço.
2. Correlacionar os resultados imunohistoquímicos com os dados clínicos e histopatológicos destes mesmos tumores.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1. Amostras Estudadas

Foram utilizados sessenta e nove blocos de parafina de CECs de cabeça e pescoço diagnosticados e tratados no período de 1999 a 2000 no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer - A.C. Camargo, São Paulo. Todas as amostras foram provenientes de peças cirúrgicas e 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 na última avaliação foram coletadas das fichas clínicas, através de um formulário padronizado (Anexo I). Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (Anexo II).

4.2. Análise Histopatológica

Para a análise histopatológica foram realizados cortes de 5 μ m de espessura dos tecidos incluídos em parafina e as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E). O critério de Anneroth *et al.* (1987) foi usado para determinar o grau de diferenciação celular de cada tumor (Yorioka *et al.*, 2002).

4.3. Reações Imunohistoquímicas

Para a realização das reações imunohistoquímicas, todos os blocos foram cortados na espessura de 3 μ m e os fragmentos colocados sobre lâminas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma Chemical Company, EUA).

Inicialmente, os cortes foram desparafinizados através de duas trocas de xilol, sendo a primeira de 30 minutos em estufa a 56°C e a segunda a temperatura ambiente, por 20 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 então bloqueada com H₂O₂ (10 volumes) a 3% em cinco incubações de cinco minutos cada, após os quais os cortes foram lavados em água corrente. A recuperação antigênica foi feita através da imersão das lâminas em um recipiente contendo 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 doze minutos cada. As lâminas foram a seguir resfriadas em água corrente e colocadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 10mM (pH 7,0).

Numa fase preliminar do estudo, foram realizadas padronizações a fim de se encontrar a diluição ideal para cada um dos anticorpos primários e secundários utilizados. Os anticorpos primários e as suas respectivas diluições foram as seguintes: anti-ácido graxo sintetase (Transduction Laboratories, EUA, 1:3.000), anti-receptor de andrógeno (Upstate Biotechnology, PG-21, EUA, 1:200), anti-Ki-67 (Dako, Dinamarca, MIB-1, 1:200) e anti-ErbB2 (Dako, EUA, 1:200). Os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma, EUA) e 0,1%, de azida sódica (NaN₃) em câmara úmida, por um período de 16 horas a 4°C. A seguir, os cortes foram lavados com três trocas de tampão PBS e incubados durante trinta minutos a 37°C 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. Em seguida, os cortes foram lavados com três trocas de tampão PBS e incubados com complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Strept ABC – Complex/HRP Duet Kit, Dako, 1:500) por mais trinta minutos 37°C. Antes da revelação com o substrato cromogênico, as lâminas foram lavadas novamente com PBS e as reações então evidenciadas com solução de tetracloreto de 3,3' diaminobenzidina (DAB, Sigma, EUA) a 0,06% em PBS contendo 1ml de H₂O₂ a

10 volumes e 1ml de 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.

4.4. Análise dos Resultados

Após a realização das reações imunohistoquímicas os resultados foram analisados em microscópio óptico. No caso de marcação citoplasmática, como para FAS e ErbB2, as intensidades foram avaliadas por três observadores de maneira independente e agrupadas nas categorias abaixo:

- : Reação negativa.
- +: Reação com intensidade fraca.
- ++: Reação com intensidade moderada.
- +++ : Reação com intensidade forte.

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 dos resultados de 10 campos microscópicos (aumento de 400x) consecutivos 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. Os resultados foram digitados em uma planilha eletrônica (EXCEL 9.0/2000, Microsoft, EUA).

4.5. Análises Estatísticas

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 freqüências 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.

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 e imunohistoquímicas), 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 e imunohistoquímicas), foi analisada pelo teste de log-rank.

5. RESULTADOS

5. Resultados

Os casos de CEC da região de cabeça e pescoço descritos no presente trabalho foram acompanhados por um período mínimo de 1,6 e máximo de 48,2 meses, sendo todos tumores primários sem tratamento prévio.

5.1. Características Clínicas e Epidemiológicas da Amostra Estudada

Dos 62 pacientes analisados, 56 (90,32%) eram do gênero masculino e apenas 6 (9,68%) do gênero feminino. A idade dos pacientes no momento do diagnóstico variou de 22 a 89 anos, sendo a média de 58,6 anos. Trinta e dois casos (51,6%) tinham idade menor ou igual 58,6 anos e 30 casos (48,4%) possuíam idade superior a 58,6 anos (Figura 1, Tabela 2). O tempo de queixa ou período médio entre o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas e a consulta inicial foi em média 6,4 meses, variando de 1 a 48 meses.

História de consumo de bebidas alcoólicas foi observada em 30 casos (48,39%) e o hábito de fumar tabaco foi relatado por 52 pacientes (83,67%) (Figura 1, Tabela 2). O consumo de álcool associado ao hábito de fumar foi encontrado em 30 casos (57,7%), logo, todos os pacientes que consumiam álcool fumavam, porém nem todos os pacientes que fumavam associavam o vício com a ingestão de bebidas alcoólicas.

Dos casos estudados 44 (70,97%) estavam localizados na cavidade oral, 10 (16,13%) na laringe e 8 (12,90%) na região orofaríngea (Tabela 2). Dentre os tumores localizados na cavidade oral, o local mais freqüentemente acometido foi a língua (17 casos ou 38,6%), seguido pelo assoalho bucal (9 casos ou 20,5%), palato (8 casos ou 18,2%), região retromolar (6 casos ou 13,6%), gengiva (3 casos ou 6,8%) e mucosa jugal (1 caso ou 2,3%).

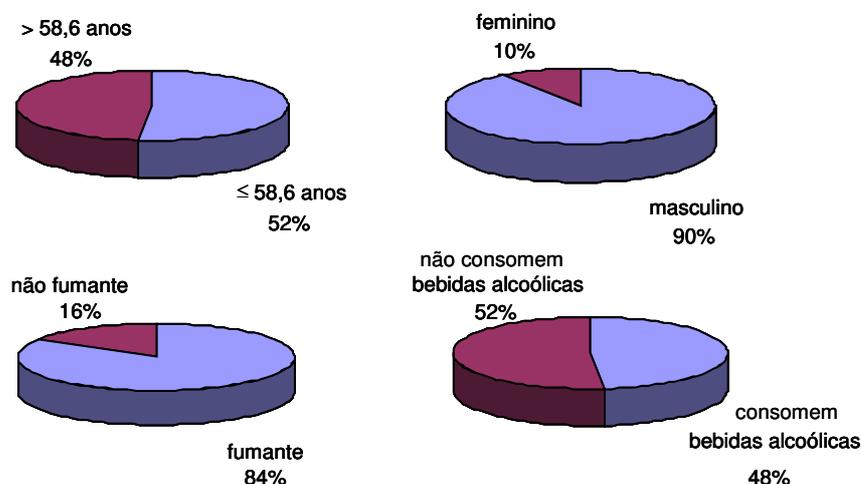


Figura 1. Distribuição da amostra estudada segundo idade, sexo, hábito de fumar e consumo de bebidas alcoólicas.

De acordo com os critérios estabelecidos pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), 8 casos (12,9%) foram classificados como sendo T1, ou seja, o tamanho do tumor primário não ultrapassou 2cm. Em 19 casos (30,6%) o tumor foi classificado como T2, pois apresentava mais de 2cm, com no máximo 4 cm. Em 21 casos (33,9%) o tumor era maior que 4cm, sendo classificado como T3 e em 14 pacientes (22,6%) o tumor já invadia as estruturas adjacentes e foi classificado como T4 (Figura 2).

Na maioria dos casos (37 pacientes ou 61,3%) não foram constatadas metástases nos linfonodos regionais, sendo os tumores classificados como N0. Em 25 pacientes (38,7%) havia metástases nos linfonodos regionais, sendo estes classificados como N+, independentemente do tamanho ou localização (homolaterais, bilaterais, ou contralaterais) (Figura 2). Nenhum paciente estudado possuía metástases à distância no momento do diagnóstico.

A distribuição da amostra com relação as variáveis acima e localização da lesão primária pode ser observada na Tabela 2.

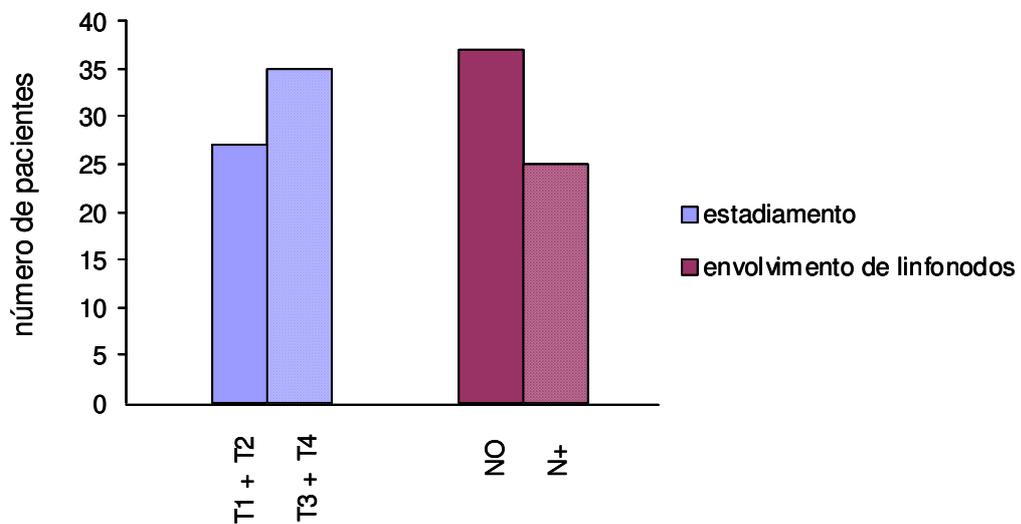


Figura 2. Distribuição dos CECs da região de cabeça e pescoço de acordo com o estadiamento clínico.

5.2. Características Histopatológicas

A análise dos preparados histológicos corados com hematoxilina e eosina revelou em todas as amostras a 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), 21 casos (33,9%) foram classificados como grau I, isto é, o tumor estava bem diferenciado exibindo morfologia semelhante ao do tecido epitelial normal. A maioria dos espécimes (32 casos ou 51,6%) foi classificada como sendo grau II, somente 4 casos (6,4%) enquadraram-se no grau III e 5 (8,1%) no grau IV (Figura 3). Para possibilitar a análise estatística desta amostragem, os graus histológicos III e IV foram agrupados. A distribuição da amostra de acordo com o sítio primário encontra-se na Tabela 2.

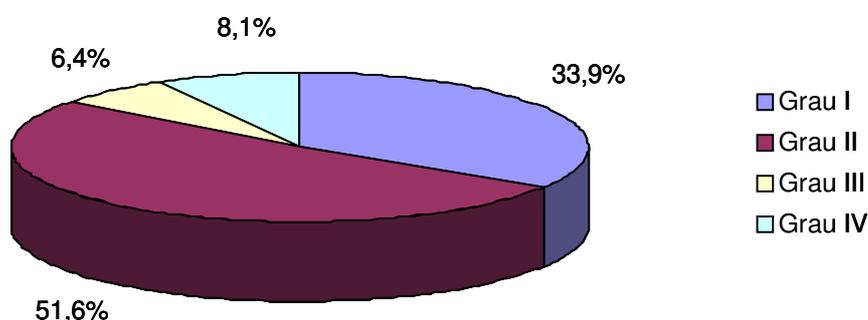


Figura 3. Distribuição dos casos de CEC de cabeça e pescoço estudados, de acordo com o grau de diferenciação histológica das lesões.

Tabela 2. Dados clinicopatológicos, demográficos e de estilo de vida dos casos de CEC da região de cabeça e pescoço, distribuídos de acordo com a localização da lesão primária.

Variáveis		Localização da lesão primária n (%)		
		Boca	Orofaringe	Laringe
Idade	≤ 58 anos	26 (59,1)	3 (37,5)	3 (30)
	> 58 anos	18 (40,9)	5 (62,5)	7 (70)
Gênero	Masculino	38 (86,4)	8 (100)	10 (100)
	Feminino	6 (13,6)	0 (0)	0 (0)
Hábito de fumar	Sim	35 (79,6)	7 (87,5)	10 (100)
	Não	9 (20,4)	1 (12,5)	0 (0)
Consumo de álcool	Sim	19 (43,2)	4 (50)	7 (70)
	Não	25 (56,8)	4 (50)	3 (30)
Grau Histológico	I	17 (38,6)	0 (0)	4 (40)
	II	21 (47,8)	6 (75)	5 (50)
	III + IV	6 (13,6)	2 (25)	1 (10)
Estadiamento T	T1 + T2	21 (47,7)	2 (25)	4 (40)
	T3 + T4	23 (52,3)	6 (75)	6 (60)
Linfonodos	NO	27 (61,4)	3 (37,5)	7 (70)
	N+	17 (38,6)	5 (62,5)	3 (30)
Margens cirúrgicas	Livres	33 (89,2)	7 (87,5)	8 (88,9)
	Comprometidas	4 (10,8)	1 (12,5)	1 (11,1)
Recorrência Local	Não	34 (77,3)	7 (87,5)	7 (70)
	Sim	10 (22,7)	1 (12,5)	3 (30)
Recorrência Regional	Não	41 (93,2)	5 (62,5)	10 (100)
	Sim	3 (6,8)	3 (37,5)	0 (0)
Recorrência Distância	Não	37 (84,1)	5 (62,5)	9 (90)
	Sim	7 (15,9)	3 (37,5)	1 (10)
Morte	Sim	23 (52,3)	5 (62,5)	6 (60)
	Não	21 (47,7)	3 (37,5)	4 (40)

5.3. Análise Imunohistoquímica

A expressão das proteínas FAS, ErbB2 e Ki-67 foi estudada através de reações imunohistoquímicas nos 62 casos deste trabalho. A produção de RA foi inicialmente avaliada em um subgrupo de tumores, os quais foram todos negativos, apesar das diversas formas de recuperação antigênica aplicadas. Assim, a expressão da proteína RA não foi avaliada em todos os casos deste trabalho.

5.3.1. Expressão de FAS

As reações para detecção da enzima FAS tiveram, em todas as amostras, um padrão de positividade citoplasmático (Figura 4 A, B e C). A grande maioria dos casos (48 pacientes ou 77,4%) foi positiva para FAS e 14 tumores (22,6%) foram considerados negativos (Figura 5). Dos casos positivos, 27 (56,25%) tiveram intensidade de marcação considerada como fraca, 15 (31,25%) moderada e 6 (12,5%) foram fortemente positivos. Para a realização das correlações estatísticas houve a necessidade de agrupar os casos negativos com os casos que mostraram padrão de marcação fraca para FAS, perfazendo um total de 41 casos (67,2%). As reações consideradas como moderadas também foram agrupadas com fortemente positivas, somando assim 21 casos (32,8%). (Figura 5). A distribuição da FAS de acordo com a localização anatômica do tumor encontra-se descrita na Tabela 3.

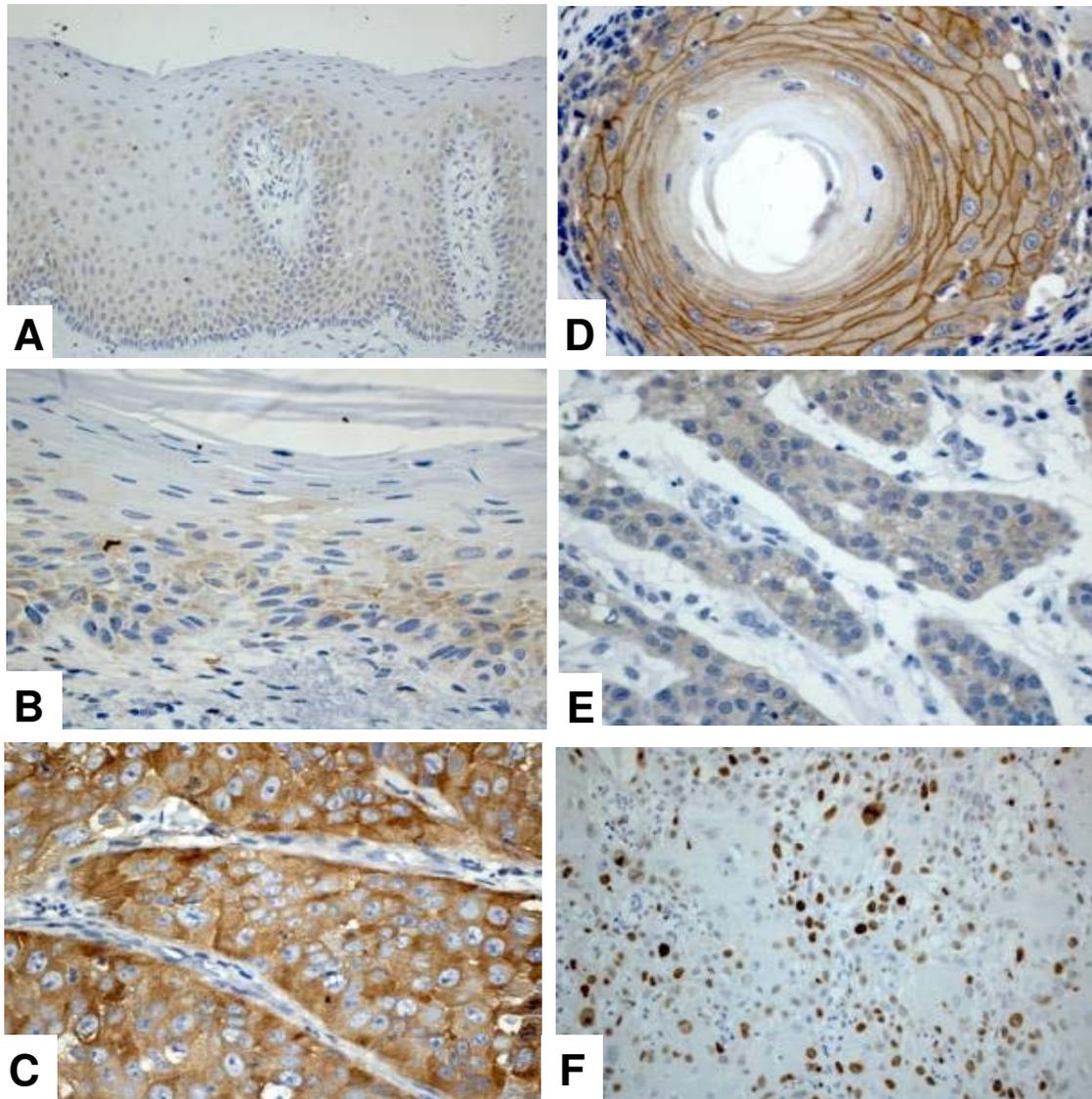


Figura 4: A expressão de FAS no epitélio normal adjacente ao tumor mostrou marcação fraca ou negativa, estando mais evidente nas camadas basais do epitélio (A). No epitélio displásico a marcação não se limita somente às camadas baixas, atingindo também a camada média do epitélio (B). Entretanto, a maioria das amostras de CECs mostraram intensa marcação citoplasmática (C). 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, e outra marcação citoplasmática (E) localizada principalmente em lesões indiferenciadas. A expressão nuclear de Ki-67 foi observada em todas as amostras estudadas (F).

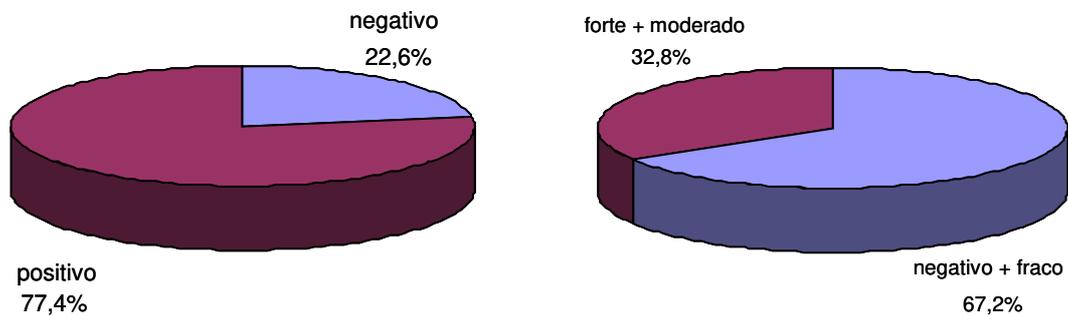


Figura 5. Distribuição dos CECs da região de cabeça e pescoço de acordo com a positividade e intensidade das reações imunohistoquímicas para FAS.

5.3.2. Expressão de ErbB2

As reações para detecção de ErbB2 exibiram dois padrões bastante distintos de marcação, um localizado na membrana plasmática e outro com padrão intra-citoplasmático (Figura 4 D e E). A membrana plasmática foi positiva em 47 casos (77%) e negativa em 14 casos (23%). Dos casos positivos, 19 (31,1%) foram classificados como fracos e 28 (45,9%) como fortes (Figura 6). Em 56 casos (91,8%) houve marcação positiva no citoplasma, sendo 5 (8,2%) negativos nesta região das células. Dentre os casos com marcação citoplasmática, em 33 (54,1%) a intensidade foi fraca e em 23 (37,7%) forte (Figura 7). A distribuição da positividade para ErbB2 segundo a localização da lesão primária está mostrada na Tabela 3.

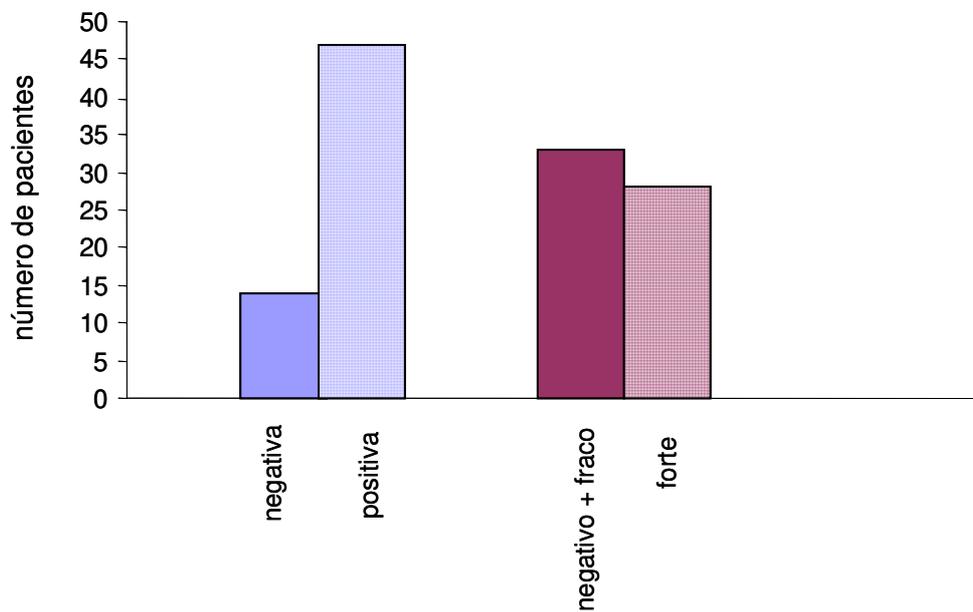


Figura 6. Distribuição dos casos de acordo com a positividade e intensidade da marcação imunohistoquímica para ErbB2 em membrana.

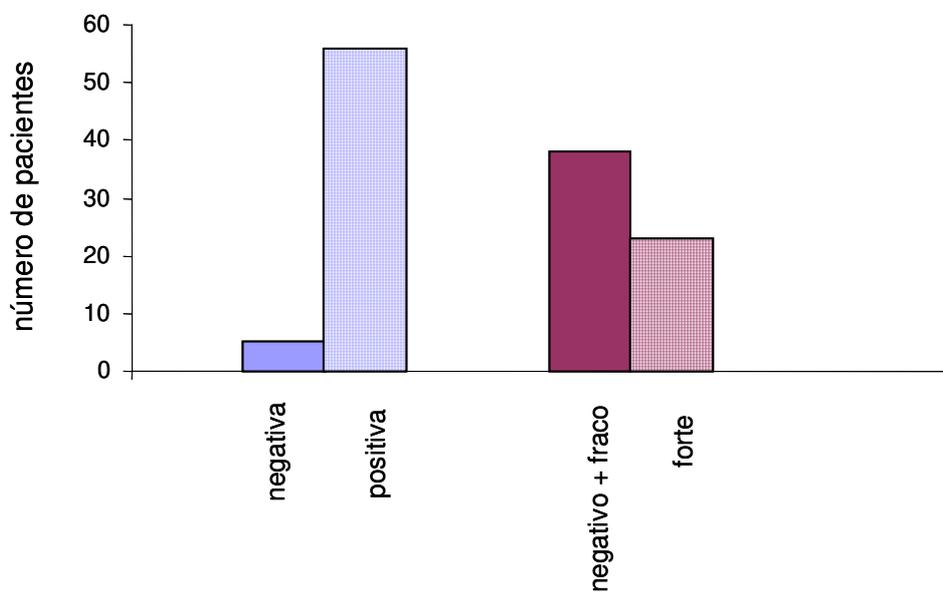


Figura 7. Distribuição dos casos de acordo com a positividade e intensidade da marcação imunohistoquímica para ErbB2 no citoplasma.

Tabela 3. Resultados das reações imunohistoquímicas segundo a localização primária da lesão.

Variáveis	Categorias	Localização Primária n (%)		
		Boca	Orofaringe	Laringe
ErbB2 (membrana)	Negativa	9 (20,9)	4 (50)	1 (10)
	Positiva	34 (79,1)	4 (50)	9 (90)
Intensidade (membrana)	1	23 (53,5)	6 (75)	4 (40)
	2	20 (46,5)	2 (25)	6 (60)
ErbB2 (citoplasma)	Negativa	2 (4,7)	2 (25)	1 (10)
	Positiva	41 (95,3)	6 (75)	9 (90)
Intensidade (citoplasma)	1	28 (65,1)	5 (62,5)	5 (50)
	2	15 (34,9)	3 (37,5)	5 (50)
FAS	1	31 (72,1)	5 (62,5)	5 (50)
	2	12 (27,9)	3 (37,5)	5 (50)
Ki-67	≤ 34,7	29 (65,9)	3 (37,5)	6 (60)
	> 34,7	15 (34,1)	5 (62,5)	4 (40)

1: Intensidade de marcação negativa ou fraca

2: Intensidade de marcação moderada ou forte

5.3.3. Expressão de Ki-67

Todos os casos da amostra estudada mostraram positividade nuclear para o antígeno de proliferação Ki-67, sendo que a porcentagem de células positivas variou de 7,4 a 72,9, com média de 34,7. Em 38 casos (61,3%) o índice de positividade foi menor ou igual a 34,7 e em 24 casos (38,7%) maior que 34,7 (Figura 8). A coloração nuclear para Ki-67 foi facilmente identificada e todas as células marcadas, independentemente da intensidade, foram consideradas como positivas durante o cálculo do índice de positividade para este antígeno (Figura 4 F). A distribuição da positividade para o marcador Ki-67 de acordo com o local da lesão primária está mostrada na Tabela 3.

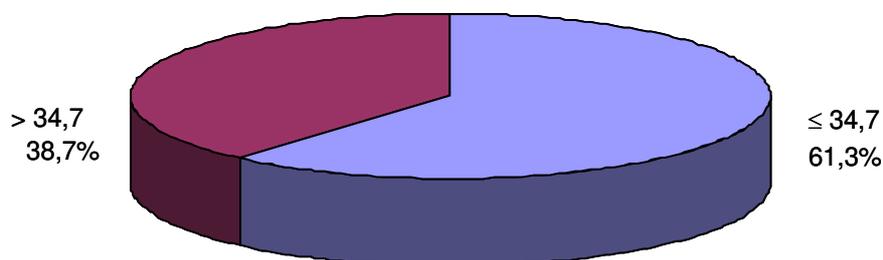


Figura 8. Distribuição dos casos de acordo com a porcentagem de células positivas para o antígeno Ki-67.

5.4. 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 do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Dos casos estudados, 13 pacientes (21%) foram tratados somente com cirurgia, 38 casos (61,3%) com cirurgia associada à radioterapia e 2 (3,2%) com cirurgia associada à radioterapia e quimioterapia (Figura 9). Entretanto, 5 pacientes (8,1%) foram tratados apenas com radioterapia. A radioterapia foi realizada previamente a cirurgia ou a quimioterapia em 3 casos (4,8%) e nenhum caso foi tratado somente com quimioterapia. No total, a quimioterapia foi utilizada em 4 casos associada com a cirurgia e/ou radioterapia. Já a radioterapia foi realizada em 48 casos, associada ou não aos outros tipos de tratamento (Figura 9).

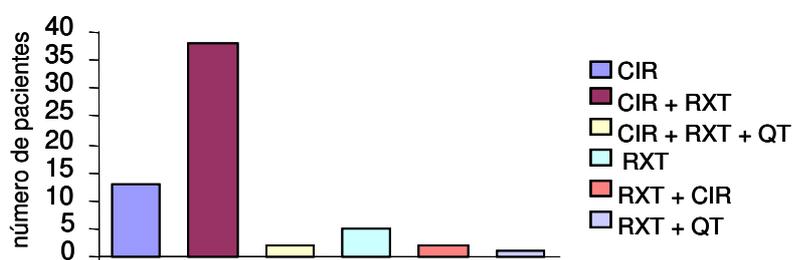


Figura 9. Distribuição dos casos de CEC da região de cabeça e pescoço de acordo com o tipo de tratamento realizado.

5.5. Presença de Recorrências Locais e Metástases

Durante o período estudado, 39 pacientes (62,9%) não apresentaram nenhuma forma de recorrência do CEC, entretanto, em 23 casos (37,1%) houve recorrência da lesão. O tempo médio de detecção das recorrências do tumor foi de 10,5 meses após o início do tratamento, variando de 3 a 37 meses.

Dos casos que recorreram, 9 (39,1%) foram recidivas locais, em 2 (8,7%) a recorrência foi local e regional e em 3 casos (13%) a recorrência foi local e a distância. Apenas 1 paciente (4,5%) teve recorrência somente regional, 5 casos (21,7%) recorreram somente a distância e em 3 casos (13%) a recorrência foi regional e a distância. Nenhum paciente teve os três tipos de recidivas simultaneamente. No total, 14 casos (22,58%) recorreram localmente, 6 (9,68%) em linfonodos regionais e 11 (17,74%) produziram metástases a distância para os pulmões, ossos, cérebro e pele (Figura 10). A distribuição das recidivas segundo a localização primária da lesão está demonstrada na Tabela 2.

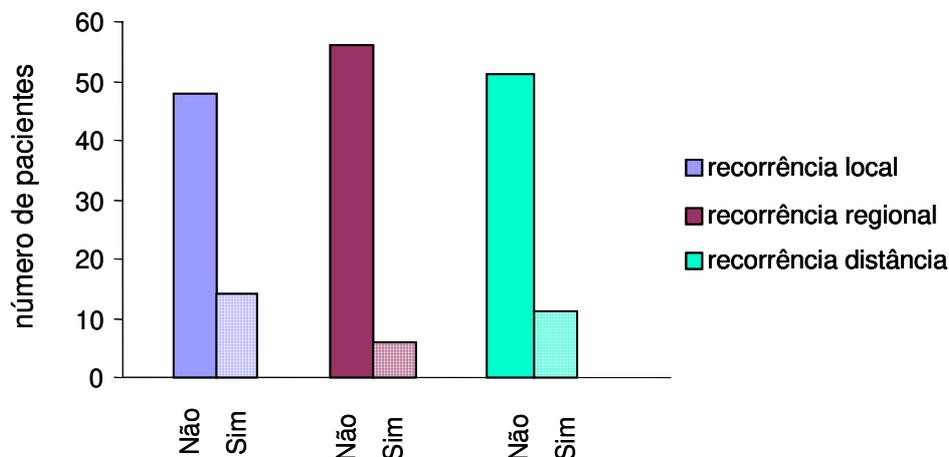


Figura 10. Distribuição das recorrências dos CECs da região de cabeça e pescoço de acordo com o local.

5.6. Situação Clínica dos Pacientes até a Data da Última Informação Obtida

O tempo de seguimento dos pacientes que compuseram esta amostra variou de 1,6 a 48,2 meses, com uma média de 21,9 meses. De acordo com a última informação obtida, 34 pacientes (54,8%) evoluíram para óbito, sendo 30 casos (48,4%) devido à doença, 3 (4,8%) durante o tratamento e 1 (1,6%) por outros motivos. Dos pacientes vivos, 23 (37,1%) estavam livres da doença. Cinco casos (8,1%) foram perdidos de vista, ou seja, não se conseguiu nenhuma informação após o tratamento (Figura 11).

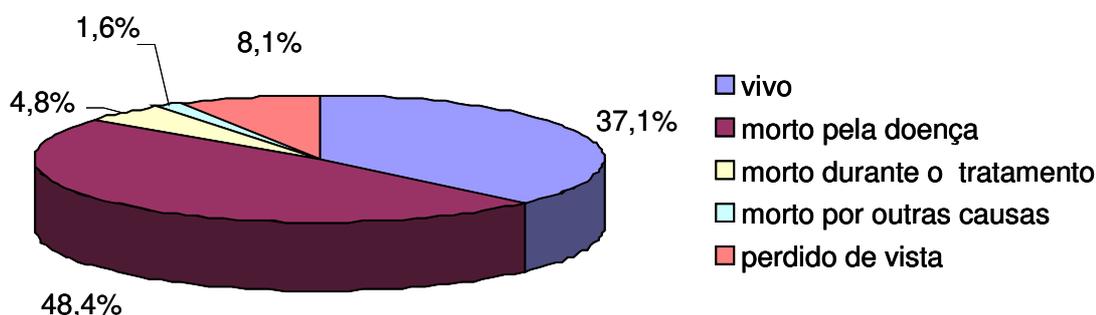


Figura 11. Distribuição dos casos de CEC de cabeça e pescoço de acordo com a situação clínica na última avaliação.

5.7. Correlações de Frequência

A positividade para FAS foi mais intensa nas lesões histologicamente bem diferenciadas, no entanto, essa correlação não foi estatisticamente significativa (Tabela 4). Uma observação importante foi o fato de uma grande porcentagem (81,25%) das células fortemente positivas para FAS serem também intensamente marcadas para ErbB2, com correlação positiva estatisticamente significativa ($p = 0,01$). Observamos também uma associação entre o estadiamento clínico dos tumores com a expressão de FAS ($p = 0,07$) (Tabela 4).

A marcação para ErbB2 foi correlacionada positivamente com o grau histológico dos tumores, sendo as áreas bem diferenciadas, com formação de pérolas de queratina, mais fortemente marcadas na membrana plasmática. Entretanto, nas áreas menos diferenciadas, com maior pleomorfismo celular, a expressão citoplasmática de ErbB2 foi mais evidente (Figura 4 D e E). Assim, a maioria dos tumores bem diferenciados (grau I) apresentou-se positiva para ErbB2 ($p = 0,01$), sendo esta marcação mais intensa na membrana plasmática no grau I do que nos graus II, III ou IV ($p = 0,01$) (Tabela 4).

O estudo estatístico dos nossos resultados revelou também uma associação significativa entre a idade dos pacientes e a positividade nuclear para o antígeno Ki-67, sendo a quantidade de células positivas maior em pacientes acima dos 58 anos ($p = 0,05$) (Tabela 4). Um achado interessante foi que tanto a expressão de Ki-67 como a expressão citoplasmática de ErbB2 foram associadas ao consumo de álcool ($p = 0,07$ e $p < 0,02$, respectivamente) (Tabela 4). Não houve associação entre a expressão de FAS e ErbB2 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		ErbB2 membrana				ErbB2 citoplasma				FAS		Ki-67	
		Positividade		Intensidade		Positividade		Intensidade		Intensidade		≤ 34,7	> 34,7
		Não	Sim	1	2	Não	Sim	1	2	1	2		
Idade (anos)	≤ 58	7 (50)	24 (51,1)	15 (45,5)	16 (57,1)	2 (40)	29 (51,8)	18 (47,4)	13 (56,5)	20 (48,8)	11 (55)	23 (60,5)	9 (37,5)*
	> 58	7 (50)	23 (48,9)	18 (54,5)	12 (42,9)	3 (60)	27 (48,2)	20 (52,6)	10 (43,5)	21 (51,2)	9 (45)	15 (39,5)	15 (62,5)
Gênero	Masculino	13 (92,9)	43 (91,5)	31 (92,9)	25 (89,3)	5 (100)	51 (91,1)	33 (86,8)	23 (100)	38 (92,7)	17 (85)	34 (89,5)	22 (91,7)
	Feminino	1 (7,1)	4 (8,5)	2 (6,1)	3 (10,7)	0 (0)	5 (8,9)	5 (13,2)	0 (0)	3 (7,3)	3 (15)	4 (10,5)	2 (8,3)
Hábito de Fumar	Sim	10 (71,4)	41 (87,2)	27 (81,8)	24 (85,7)	4 (80)	47 (83,9)	31 (81,6)	20 (87)	35 (85,4)	16 (80)	30 (79)	22 (91,7)
	Não	4 (28,6)	6 (12,8)	6 (18,2)	4 (14,3)	1 (20)	9 (16,1)	7 (18,4)	3 (13)	6 (14,6)	4 (20)	8 (21)	2 (8,3)
Consumo de Álcool	Sim	6 (42,9)	24 (51,1)	16 (48,5)	14 (50)	1 (20)	29 (51,8)	15 (39,5)	15 (65,2)**	20 (48,8)	9 (45)	15 (39,5)	15 (62,5)
	Não	8 (57,1)	23 (48,9)	17 (51,5)	14 (50)	4 (80)	27 (48,2)	23 (60,5)	8 (34,8)	21 (51,2)	11 (55)	23 (60,5)	9 (37,5)
Grau histológico	I	1 (7,1)	20 (42,6)	6 (18,1)	15 (53,6)	1 (20)	20 (35,7)	12 (31,6)	9 (39,1)	12 (29,3)	9 (45)	16 (42,1)	5 (20,8)
	II	9 (64,3)	23 (48,9)	22 (66,7)	10 (35,7)	4 (80)	28 (50,0)	20 (52,6)	12 (52,2)	22 (53,7)	9 (45)	19 (50)	13 (54,2)
	III + IV	4 (28,6)	4 (8,5)	5 (15,2)	3 (10,7)	0 (0)	8 (14,3)	6 (15,8)	2 (8,7)	7 (17,1)	2 (10)	3 (7,9)	6 (25)
Estadiamento T	T1 + T2	5 (35,7)	22 (46,8)	16 (48,5)	11 (39,3)	1 (20)	26 (46,4)	16 (42,1)	11 (47,8)	20 (48,8)	6 (30)	18 (47,4)	9 (37,5)
	T3 + T4	9 (64,3)	25 (53,2)	17 (51,5)	17 (60,7)	4 (80)	30 (53,6)	22 (57,9)	12 (52,2)	21 (51,2)	14 (70)	20 (52,6)	15 (62,5)
Linfonodos	N0	9 (64,3)	27 (57,5)	21 (63,6)	15 (53,6)	4 (80)	32 (57,1)	25 (65,8)	11 (47,8)	26 (63,4)	10 (50)	25 (65,8)	12 (50)
	N+	5 (35,7)	20 (42,5)	12 (36,4)	13 (46,4)	1 (20)	24 (42,9)	13 (34,2)	12 (52,2)	15 (36,6)	10 (50)	13 (34,2)	12 (50)
Margens Cirúrgicas	Livres	13 (100)	35 (85,4)	28 (96,5)	20 (80)	5 (100)	44 (88)	29 (87,9)	19 (90,5)	34 (9,9)	14 (82,4)	31 (88,6)	16 (88,9)
	Comprometida	0 (0)	6 (14,6)	1 (3,5)	5 (20)	0 (0)	6 (12)	4 (12,1)	2 (9,5)	3 (8,1)	3 (17,6)	4 (11,4)	2 (11,1)
Recorrência Local	Ausente	11 (78,6)	36 (76,6)	25 (75,8)	22 (78,6)	4 (80)	43 (76,8)	30 (78,9)	17 (73,9)	31 (75,6)	16 (80)	28 (73,7)	20 (83,3)
	Presente	3 (21,4)	11 (23,4)	8 (24,2)	6 (21,4)	1 (20)	13 (23,2)	8 (21,1)	6 (26,1)	10 (24,4)	4 (20)	10 (26,3)	4 (16,7)
Recorrência Cervical	Ausente	12 (85,7)	43 (91,5)	29 (87,9)	26 (92,9)	5 (100)	50 (89,3)	34 (89,5)	21 (91,3)	36 (87,8)	19 (95)	35 (92,1)	21 (87,5)
	Presente	2 (14,3)	4 (8,5)	4 (12,1)	2 (7,1)	0 (0)	6 (10,7)	4 (10,5)	2 (8,7)	5 (12,2)	1 (5)	3 (7,9)	3 (12,5)
Recorrência Distância	Ausente	12 (85,7)	38 (80,9)	27 (81,8)	23 (82,1)	4 (80)	46 (82,1)	31 (81,6)	19 (82,6)	36 (87,8)	15 (75)	33 (86,8)	18 (75)
	Presente	2 (14,3)	9 (19,1)	6 (18,2)	5 (17,9)	1 (20)	10 (17,9)	7 (18,4)	4 (17,4)	5 (12,2)	5 (25)	5 (13,2)	6 (25)
Morte	Sim	5 (35,7)	22 (46,8)	16 (48,5)	11 (39,3)	2 (40)	25 (44,6)	17 (44,7)	10 (43,5)	20 (48,8)	8 (40)	18 (47,4)	10 (41,7)
	Não	9 (64,3)	25 (53,2)	17 (51,5)	17 (60,7)	3 (60)	31 (55,4)	21 (52,3)	13 (56,5)	21 (51,2)	12 (60)	20 (52,6)	14 (58,3)

*p<0,05, ** p<0,02; 1 = negativo + fraco, 2 = moderado + forte

5.8. Tempo de Sobrevida Global

De acordo com a análise de sobrevida global, foi observado que a maioria dos pacientes evoluiu para óbito em menos de 16 meses após o início do tratamento. A sobrevida global após 2, 3 e 4 anos de acompanhamento clínico foi de 55,9%, 43,7% e 27,3% respectivamente (Tabela 5 e Figura 12). Portanto, de acordo com a última informação obtida, 28 (45,16%) dos pacientes se encontram vivos e 34 (54,84%) mortos (Tabela 2).

Segundo a localização da lesão primária, os pacientes portadores de tumores na orofaringe tiveram índices de sobrevida menores que os pacientes que tiveram lesões localizadas na cavidade oral ou na laringe, porém, essa diferença não foi significativa do ponto de vista estatístico ($p = 0,7658$) (Figura 13).

Com relação a positividade e intensidade das marcações para ErbB2, seja esta de membrana plasmática ou de citoplasma, não foram detectadas associações estatisticamente significantes (Tabela 5 e Figuras 14, 15, 16, 17), o mesmo ocorrendo com a expressão de FAS (Tabela 5 e Figura 18).

Uma informação que se destacou durante a análise dos resultados imunohistoquímicos foi o fato dos pacientes com índice de positividade para Ki-67 menor ou igual a 34,7 terem sobrevida global mais longa que aqueles com índice maior que 34,7 ($p = 0,03$) (Tabela 5 e Figura 19).

Tabela 5: Análise da sobrevida global de acordo com a marcação imunohistoquímica.

Variáveis	Categoria	Sobrevida acumulada (%)			p
		2 anos	3 anos	4 anos	
Global		55,9	43,7	27,3	
ErbB2 (membrana)	Negativa	50,0	50,0	25,0	0,6175
	Positiva	57,4	40,0	30,0	
Intensidade (membrana)	1	62,3	54,2	32,5	0,1943
	2	48,1	28,9	28,9	
ErbB2 (citoplasma)	Negativa	40,0	40,0	40,0	0,6406
	Positiva	57,2	43,6	24,9	
Intensidade (citoplasma)	1	55,0	45,0	37,5	0,6552
	2	56,5	3,1	0,0	
FAS	1	55,8	52,2	31,3	0,3449
	2	53,0	29,0	29,0	
Ki-67	≤ 34,7	64,8	50,8	30,5	0,0316
	> 34,7	41,1	32,0	32,0	

- 1: Intensidade de marcação negativa ou fraca
 2: Intensidade de marcação moderada ou forte

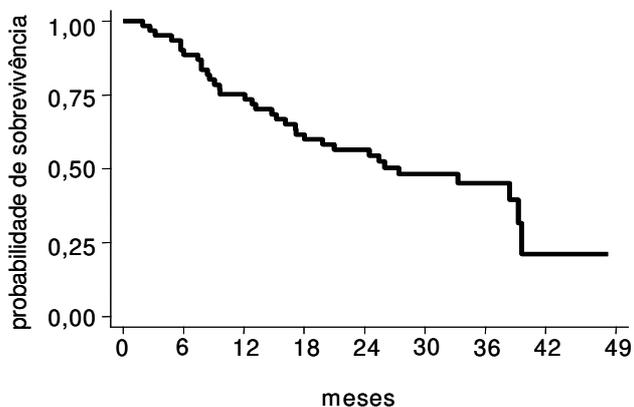


Figura 12. Análise de sobrevida global para todos os casos, de acordo com o tempo de seguimento.

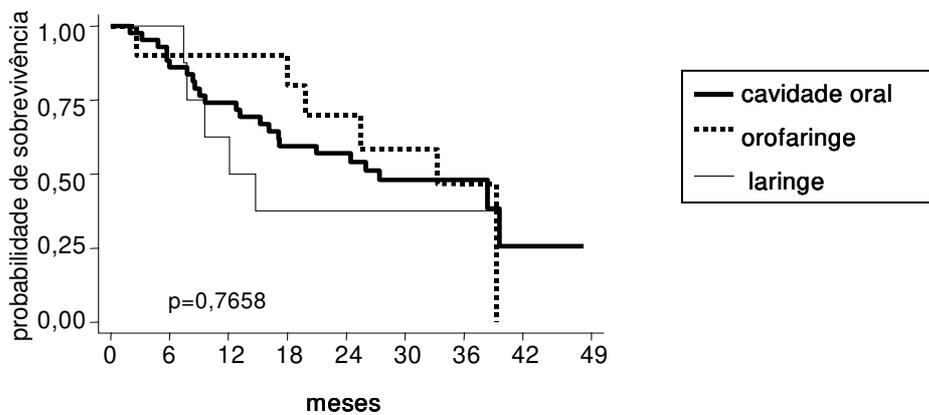


Figura 13. Análise de sobrevida global de acordo com a localização do tumor primário.

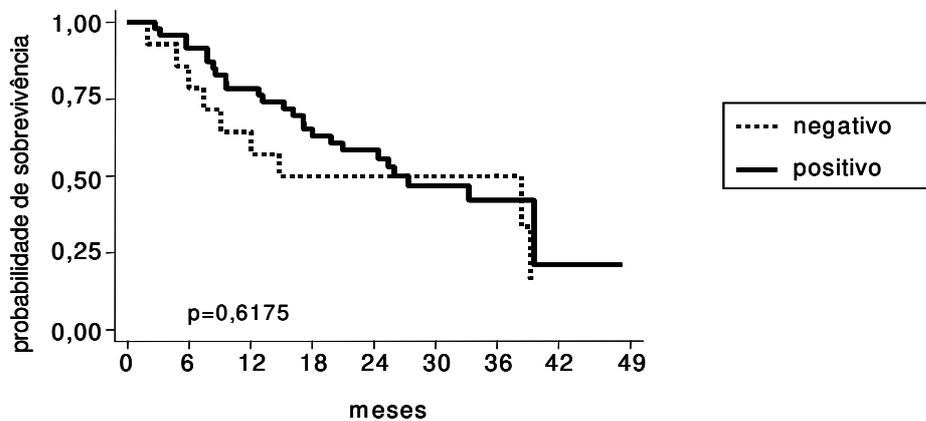


Figura 14. Análise de sobrevida global de acordo com a positividade para ErbB2 em membrana plasmática.

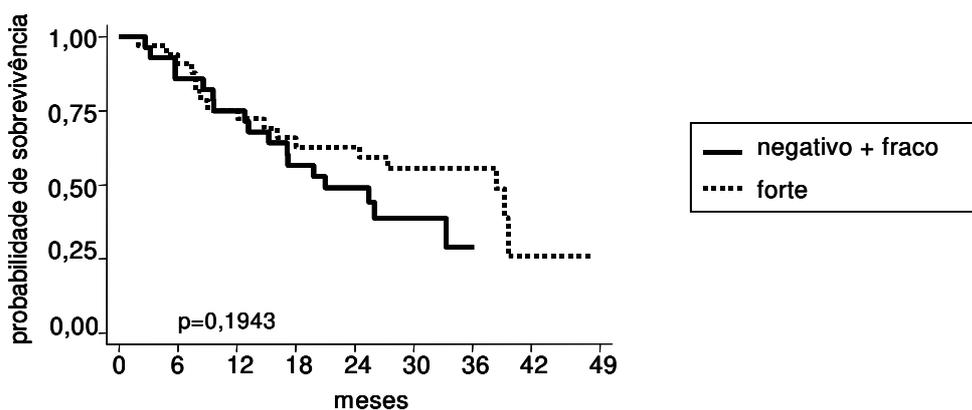


Figura 15. Análise de sobrevida global de acordo com a intensidade das reações imunohistoquímicas para ErbB2 em membrana plasmática.

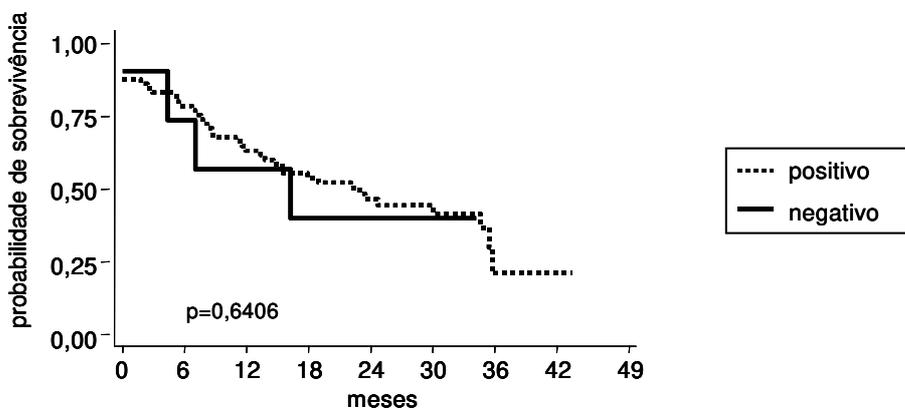


Figura 16. Análise de sobrevida global de acordo com a positividade da marcação imunohistoquímica para ErbB2 em citoplasma.

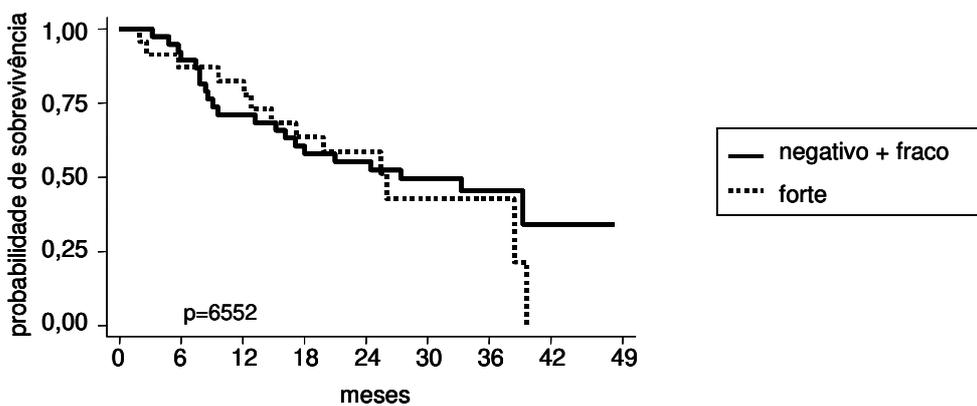


Figura 17. Análise de sobrevida global de acordo com a intensidade das reações imunohistoquímicas para ErbB2 no citoplasma.

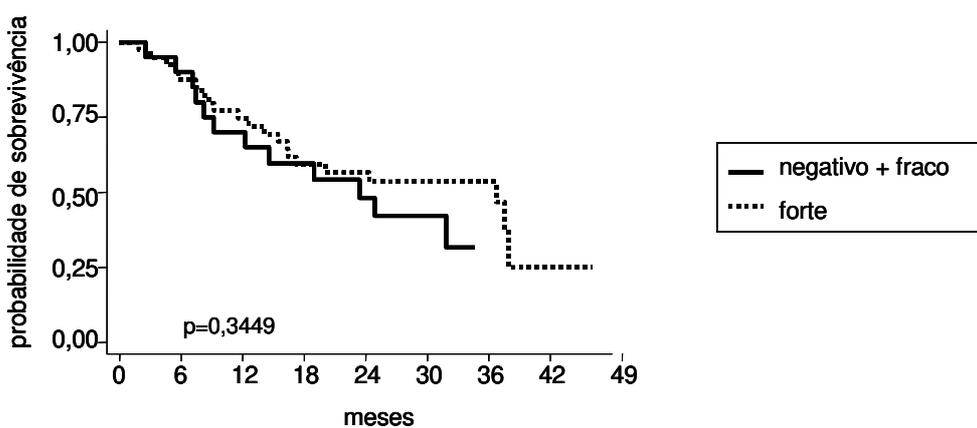


Figura 18. Análise de sobrevida global de acordo com a intensidade das reações imunohistoquímicas para detecção de FAS.

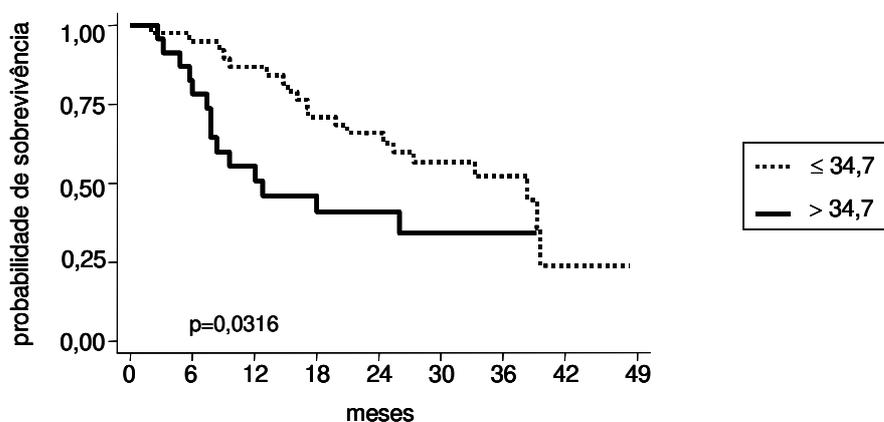


Figura 19. Análise de sobrevida global de acordo com a positividade para o antígeno Ki-67.

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 ou metástases, foi de 10,5 meses após o início do tratamento, variando de 3 a 37 meses. A sobrevida livre de doença após 2, 3 ou 4 anos de acompanhamento foi de 62,1%, 58,8% e 49,7% respectivamente (Tabela 6 e Figura 20). Dos 62 pacientes incluídos neste trabalho, 23 (37,1%) tiveram recorrência local, regional ou à distância.

Não foram detectadas associações entre a positividade imunohistoquímica para FAS, ErbB2 ou Ki-67 e o período de sobrevivência livre de doença (Tabela 6 e Figuras 21, 22, 23, 24, 25 e 26).

Tabela 6: Análise do período de sobrevida livre de doença, de acordo com a marcação imunohistoquímica para FAS, ErbB2 ou Ki-67.

Variáveis	Categoria	Sobrevida acumulada (%)			p
		2 anos	3 anos	4 anos	
Global		62,1	58,8	49,7	
ErbB2 (membrana)	Negativa	68,0	68,0	48,6	0,9249
	Positiva	60,2	55,2	55,2	
Intensidade (membrana)	1	60,2	60,2	50,2	0,9962
	2	63,8	53,1	53,1	
ErbB2 (citoplasma)	Negativa	55,6	55,6	55,6	0,7932
	Positiva	62,5	58,7	48,0	
Intensidade (citoplasma)	1	61,2	61,2	51,0	0,7665
	2	61,5	47,9	47,9	
FAS	1	67,8	63,1	52,6	0,5483
	2	55,4	55,4	55,4	
Ki-67	≤ 34,7	66,9	62,4	52,0	0,2248
	> 34,7	53,4	53,4	53,4	

- 1: Intensidade de marcação negativa ou fraca
 2: Intensidade de marcação moderada ou forte

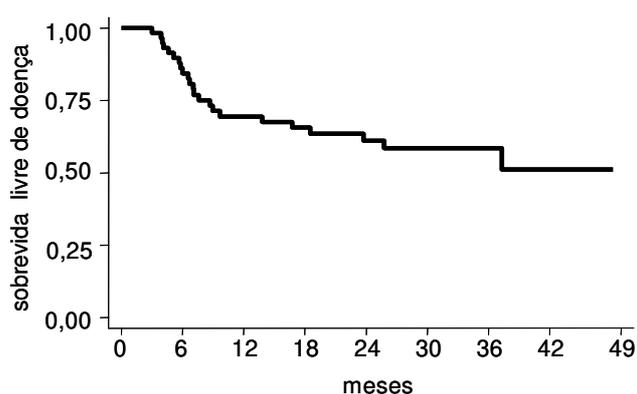


Figura 20. Análise da sobrevida livre de doença de acordo com o tempo de seguimento.

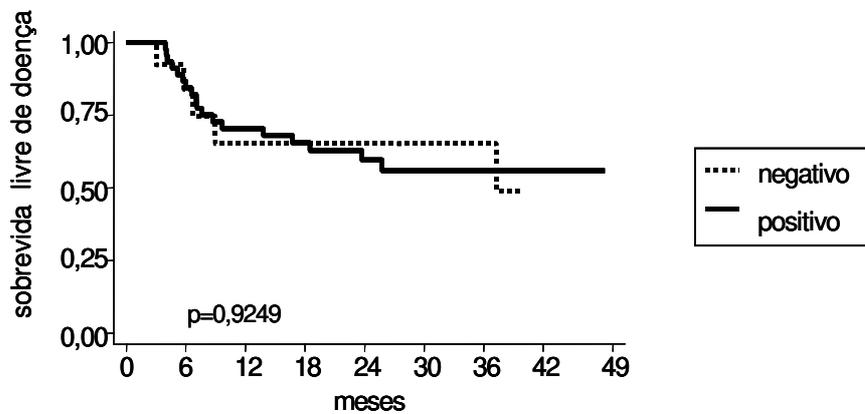


Figura 21. Análise da sobrevida livre de doença de acordo com a positividade para ErbB2 em membrana plasmática.

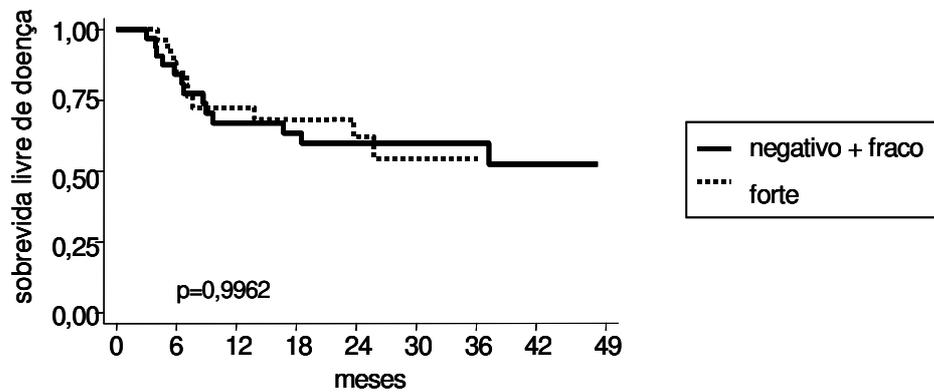


Figura 22. Análise da sobrevida livre de doença de acordo com a intensidade das marcações imunohistoquímicas para ErbB2 na membrana plasmática.

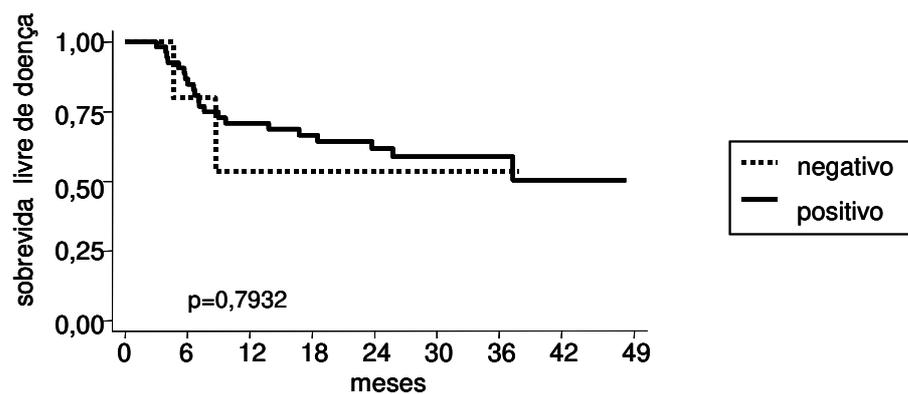


Figura 23. Análise da sobrevida livre de doença de acordo com a positividade para ErbB2 no citoplasma.

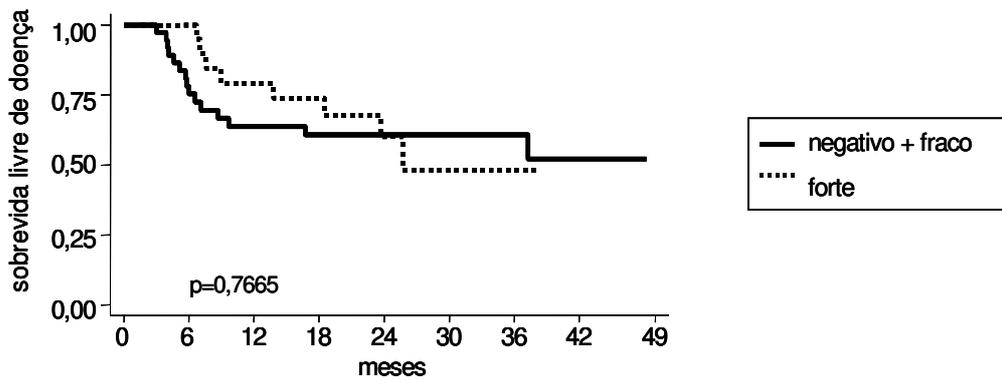


Figura 24. Análise da sobrevida livre de doença de acordo com a intensidade da marcação para ErbB2 no citoplasma.

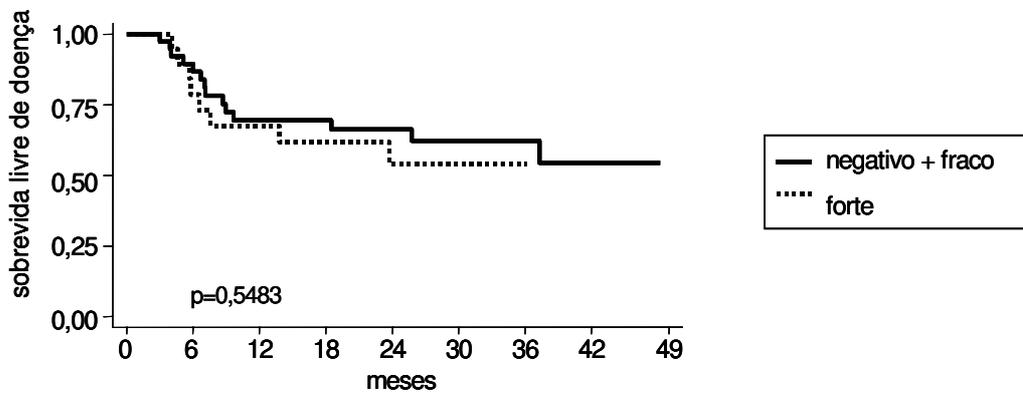


Figura 25. Análise da sobrevida livre de doença de acordo com a intensidade da marcação imunohistoquímica para FAS.

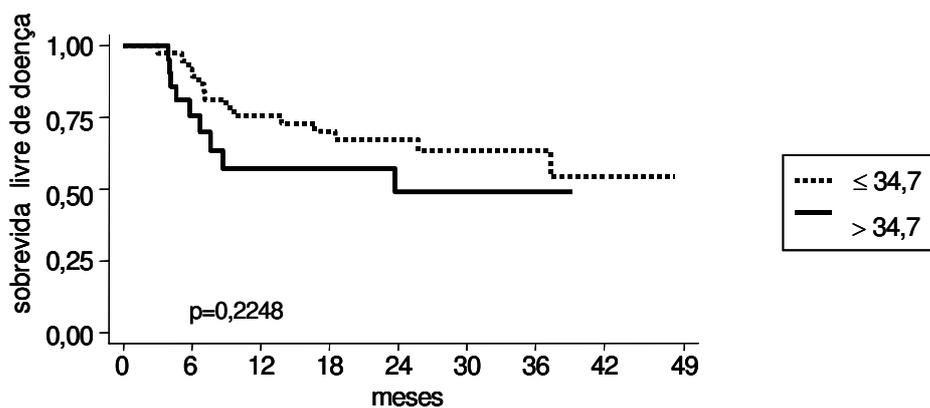


Figura 26. Análise da sobrevida livre de doença de acordo com o índice de positividade para o antígeno Ki-67.

6. DISCUSSÃO

6. Discussão

Existem diversas evidências recentes na literatura que sugerem um papel fundamental para a biossíntese endógena de ácidos graxos na patogênese de neoplasias malignas. Um número crescente de estudos mostrando que a expressão de FAS está elevada em diversos tumores humanos (Epstein *et al.*, 1995; Pizer *et al.*, 1996; Alo *et al.*, 1996; Krontiras *et al.*, 1999; Oskouian, 2000; Piyathilake *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2000; Alo *et al.*, 2000; Dhanasekaran *et al.*, 2001; Welsh *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Kusakabe *et al.*, 2002; Swinnen *et al.*, 2002; Kusakabe *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2003; Visca *et al.*, 2003; Innocenzi *et al.*, 2003, Takahiro *et al.*, 2003) vem sendo publicado a cada ano. Esta alta produção de FAS provavelmente confere vantagens para a sobrevivência e o crescimento das células malignas, pois se correlaciona positivamente, em tumores de próstata, mama, ovário, colon, melanoma e sarcomas de partes moles (Epstein *et al.*, 1995; Alo *et al.*, 1996, Gansler *et al.*, 1997, Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000, Oskouian, 2000; Innocenzi *et al.*, 2003; Takahiro *et al.*, 2003) com um pior prognóstico para os pacientes. Segundo alguns autores, as neoplasias malignas que expressam altas quantidades de FAS possuem um comportamento biológico mais agressivo, se comparadas com aquelas que produzem relativamente menos desta enzima (Epstein *et al.*, 1995; Alo *et al.*, 1996; Gansler *et al.*, 1997; Vlad *et al.*, 1999; Kuhajda, 2000; Myers *et al.*, 2001; Baron *et al.*, 2003). Portanto, FAS vem se tornando um atraente candidato a fator prognóstico, apesar de alguns trabalhos não terem encontrado significativa associação entre a sobrevivência dos pacientes e a intensidade da sua marcação imunohistoquímica (Kuhajda, 2000; Rashid *et al.*, 1997) e outros sugerirem uma maior expressão em lesões bem diferenciadas, como é aparentemente o caso dos CECs intrabucais (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004). Um trabalho recente realizado através da tecnologia dos “microarrays” de cDNA (Ramaswamy *et al.*, 2003) comparou o padrão de expressão gênica das metástases e suas respectivas lesões primárias de diversas

neoplasias e revelou um grupo de genes relacionados com o potencial metastático, dentre os quais estava o gene que codifica FAS.

A produção anormal de FAS pode ser o reflexo de um descontrole do ciclo celular, ou seja, uma alta atividade proliferativa aumentaria a necessidade de ácidos graxos para a síntese das membranas celulares necessárias para que ocorra a mitose. Pizer *et al.* (1998) encontraram uma correlação positiva entre os marcadores de proliferação Ki-67 e PCNA com a expressão de FAS em tumores de endométrio, entretanto, no presente trabalho não houve correlação estatisticamente significativa entre a produção de FAS e a positividade para Ki-67. A expressão de Ki-67 teve, em nossas amostras, uma relação estatisticamente significativa com um menor tempo de sobrevida global (Figura 19, $p=0,03$), o que também já foi demonstrado por outros autores em CECs de cabeça e pescoço (Sittel *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2003) e outras neoplasias malignas (Ueda *et al.*, 1989; Rudolph *et al.*, 1997; Heslin *et al.*, 1998; Sholzen & Gerdes, 2000; Takahashi *et al.*, 2002; Bozlu *et al.*, 2002; Wozniak *et al.*, 2002; Tejido Sanchez *et al.*, 2002). O fato da positividade para FAS não estar associada à expressão de Ki-67 no presente estudo não é uma surpresa, pois FAS foi mais expressa nas lesões histologicamente bem diferenciadas. Curiosamente, nos experimentos com quatro diferentes linhagens celulares derivadas de CEC bucal realizados por Agostini *et al.* (2004), a linhagem celular que mais proliferou não foi a mesma que apresentou maior expressão de FAS.

Trabalhos experimentais têm demonstrado que a atividade enzimática de FAS é essencial para a sobrevivência das células cancerosas, pois a sua inibição específica é capaz de reduzir a proliferação celular ao bloquear a replicação do DNA, causando apoptose (Furuya *et al.*, 1997, Pizer *et al.*, 1998, Li *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003). O mecanismo envolvido na comunicação entre a progressão do ciclo celular e a biossíntese endógena de ácidos graxos ainda não está elucidado. Entretanto, estudos recentes usando uma linhagem celular derivada de um adenocarcinoma de próstata dependente de andrógeno (LNCaP) mostraram que a atividade de FAS é necessária para o fornecimento dos fosfolipídios da membrana

celular (Swinnen *et al.*, 2003). Estes achados indicam que uma aceleração no processo de síntese de ácidos graxos pode ser requerida para que haja altos níveis de proliferação celular, além do que modificações na composição lipídica das membranas, como consequência de uma expressão anormal de FAS, podem ter efeitos profundos nas vias de transdução de sinal (Baron *et al.*, 2003). No presente estudo, uma expressão alta de FAS foi observada nos CECs de cabeça e pescoço, em comparação com o epitélio morfológicamente normal adjacente. Parece haver também um gradativo aumento na expressão de FAS, quando se compara o epitélio normal com lesões displásicas e com os CECs bucais (Silva & Graner, dados não publicados). Enquanto que no epitélio morfológicamente normal FAS é produzida somente pelas células da camada basal, nas displasias epiteliais e CECs a alta expressão ocorre em praticamente todas as células. Na amostra do presente trabalho houve uma maior expressão de FAS nos tumores com estadiamento clínico entre T1 e T2 e nas lesões histologicamente bem diferenciadas, o que está de acordo com o trabalho prévio de Krontiras *et al.* (1999).

A expressão de FAS é controlada por andrógenos ou pelo fator de crescimento EGF em células de câncer de próstata (Swinnen *et al.*, 1997; Swinnen *et al.*, 2000) e por progesterona em linhagens celulares de câncer de mama (Lacasa *et al.*, 2001). Andrógenos parecem não ser importantes na patogênese dos CECs bucais, pois há somente um trabalho na literatura relatando uma elevada expressão de RA em leucoplasias e CECs bucais (Bassalyk *et al.*, 1987), o que não foi confirmado posteriormente por Nehse & Tunn (1994). No presente trabalho não foi possível detectar, através de reações imunohistoquímicas com anticorpos altamente específicos, a presença da proteína RA em amostras de CECs de cabeça e pescoço. Por outro lado, um grande número de trabalhos mostra uma possível associação entre a alta expressão de EGFR ou de ErbB2 em CECs bucais (O-charoenrat *et al.*, 2000; O-charoenrat *et al.*, 2002; Holbro *et al.*, 2003). Experimentos realizados no Laboratório de Patologia Bucal da FOP/UNICAMP (Agostini *et al.*, 2004) detectaram uma alta produção de EGFR e

de ErbB2 em linhagens celulares derivadas de CECs de língua, ao passo que a quantidade da proteína RA foi muito baixa. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que concentrações altas (na ordem de nM) do fator de crescimento EGF inibem a produção de FAS ao mesmo tempo em que reduzem o crescimento celular, reforçando uma possível conexão entre esta enzima e a multiplicação das células de CEC bucal.

Os resultados do presente trabalho mostraram que a expressão de ErbB2 em membrana celular ocorreu em áreas de maior diferenciação celular, enquanto que a positividade citoplasmática estava presente nas regiões indiferenciadas. Isto provavelmente reflete a ativação e internalização do receptor, gerando sinais para a proliferação celular e para sua posterior proteólise pelo sistema ubiquitina-proteossomo. A expressão forçada da proteína ErbB2 em células epiteliais de mama é capaz de ativar a expressão de FAS (Kumar-Sinha *et al.*, 2003), sendo as células produtoras de grandes quantidades deste receptor de superfície as mais susceptíveis a apoptose induzida por c75. O oncogene ErbB2 está bem caracterizado e conhecido como uma molécula essencial para a patogênese dos tumores de mama, sendo relacionado com um pior prognóstico (Slamon, 1987; Hou *et al.*, 1992; Werkmeister *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1998; Wilkman *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1999; Werkmeister *et al.*, 2000; Bei *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2002). Neste estudo, apresentamos as primeiras evidências da associação entre a expressão de FAS e de ErbB2 em amostras de CEC de cabeça e pescoço ($p=0,01$), sugerindo que em queratinócitos bucais, a transformação maligna depende da estimulação de FAS por ErbB2. A co-expressão destas duas proteínas em lesões bem diferenciadas pode ainda ser útil para a identificação de tumores que apresentam comportamentos clínicos distintos.

Inibidores farmacológicos específicos da atividade de FAS, como o produto natural cerulenina e o composto sintético c75 possuem efeitos seletivos sobre a proliferação de células tumorais em cultura (Furuya *et al.*, 1997; Pizer *et al.*, 1998; Kuhajda, 2000; Li *et al.*, 2001). A inibição da síntese de ácidos graxos causa também a diminuição do tamanho de tumores em modelos xenográficos (Pizer *et*

al., 1996). Segundo estes autores, ocorreu uma significativa redução das lesões provocadas em camundongos pela injeção de células de uma linhagem de câncer de ovário (OVCAR-3), o que prolongou a vida dos animais. Da mesma forma, células derivadas de câncer de mama (MCF-7) implantadas nos tecidos subcutâneos de camundongos mostraram inibição da síntese de ácidos graxos, apoptose e redução do tamanho dos tumores após o início do tratamento com c-75 (Pizer *et al.*, 2000). Apesar do mecanismo exato pelo qual a inibição de FAS desencadeia apoptose não estar totalmente elucidado (Pizer *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Thupari *et al.*, 2001; Kumar-Sinha *et al.*, 2003), foi recentemente descrito por Zhou *et al.* (2003) que a inibição da atividade de FAS reduz a incorporação de fosfolipídios nas membranas ao mesmo tempo em que aumenta a oxidação destes, além de provocar acúmulo do precursor malonil-CoA. Segundo estes autores, o excesso de malonil-CoA é responsável pela indução da morte por apoptose. De fato, estudos experimentais realizados em nosso laboratório mostraram que a atividade de FAS é essencial para a proliferação de linhagens de CEC bucal, pois o tratamento com cerulenina inibiu drasticamente o crescimento destas (Agostini *et al.*, 2004). Guo *et al.* (2003) demonstraram que a cerulenina inibe a síntese de ácidos graxos em amostras teciduais frescas de CECs bucais, o que ocorre em menor extensão em fragmentos de mucosa clinicamente normal.

Apesar da grande quantidade de evidências apontando a síntese endógena de ácidos graxos como necessária para a proliferação somente de células malignas, sem qualquer efeito sobre células ou tecidos não neoplásicos, resultados recentes de nosso grupo mostram que cerulenina também bloqueia a proliferação de fibroblastos normais e de fibroblastos derivados de fibromatose gengival hereditária em culturas primárias (¹Almeida *et al.*, 2004). Isto é especialmente importante e deve ser melhor estudado para o desenvolvimento de terapias anti-neoplásicas baseadas na inibição de FAS.

¹ Almeida JP, Silva SD, Vargas PA, Coletta RD, Loda M, Graner E. Androgen-driven fatty acid synthase expression up regulates the proliferation of fibroblasts isolated from hereditary gingival fibromatosis. Em fase de elaboração.

Em resumo, nossos resultados demonstram que FAS e ErbB2 são simultaneamente expressos nos 62 casos de CEC de cabeça e pescoço estudados neste trabalho, sugerindo que ErbB2 regula a expressão de FAS nestes tumores. Além do mais, os pacientes cujos CECs expressaram altos níveis de Ki-67 tiveram um tempo de sobrevida significativamente menor do que aqueles que mostraram baixa expressão deste antígeno.

7. CONCLUSÕES

7. Conclusões

1. FAS é expressa em CECs de cabeça e pescoço humanos.
2. Tumores histologicamente bem diferenciados apresentam maior expressão de FAS e de ErbB2.
3. Há maior expressão de ErbB2 na membrana celular em áreas de maior diferenciação celular, enquanto que a positividade citoplasmática ocorre nas áreas indiferenciadas.
4. Pacientes cujos CECs expressaram maiores quantidades do antígeno Ki-67 tiveram índices de sobrevivência global menores.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas *

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; *in press.*

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.

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.

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): 1383-1388.

Anderson J. The role of androgen monotherapy in the treatment of prostate cancer. *BJU Int.* 2003; 91 (5): 455-61.

Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P. Role of alcohol and tobacco in the aetiology 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.

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

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): 229-249.

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.

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.

Bassalyk LS, Falileev GV, Kushlinskii NE, Nagibin AA. Cytoplasmic receptors of steroid sex hormones in malignant tumors and precancerous processes of the human oral mucosa. *Vopr Onkol.* 1987; 33 (1): 28-30.

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.

Boyle P, Macfarlane GJ, Maisonneuve P, Zheng T, Scully C, Tedesco B. Epidemiology of mouth cancer in 1989: a review. *J R Soc Med.* 1990; 83 (11): 724-30.

Bozlu M, Orhan D, Baltaci S, Yaman O, Elhan AH, Tulunay O, Muftuoglu YZ. The prognostic value of proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and nucleolar organizer region in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int Urol Nephrol.* 2002; 33 (1): 59-66.

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. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997; 89 (3): 331-340.

Brown MS; Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cell and blood. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*. 1999; 96 (20): 11041-11048.

Chalbos D, Joyeux C, Escot C, Galtier F, Rochefort H. Progesterin-induced fatty acid synthetase in breast cancer. From molecular biology to clinical applications. *Ann N Y Acad Sci*. 1990; 595: 67-73.

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.

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.

Cifuentes E, Mataraza JM, Yoshida BA, Menon M, Sacks DB, Barrack ER, Reddy GP. Physical and functional interaction of androgen receptor with calmodulin in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101 (2): 464-9.

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.

Cotrim P, Fregnani ER, Villalba H, Vargas PA, Almeida OP, Coletta RD. Carcinoma espinocelular bucal e suas variantes. *BCI*. 2002; 9 (32): 313-9.

Cox B, Taylor K, Treasure E. Trends in oral cancer by subsite in New Zealand. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995; 31 (2): 113-7.

Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Hobisch A. Androgen receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2002; 9 (3): 155-70.

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): 3799-3804.

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): 822-826.

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, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*. 2001; 164 (7): 1017-25.

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.

Gabrielson EW, Pinn ML, Testa JR, Kuhajda FP. Increased fatty acid synthase is a therapeutic target in mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2001; 7 (1): 153-7.

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.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984; 133 (4): 1710-5.

Graner E, Tsang D, Rossi S, Baron A, Migita T, Weinstein J, 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; *in press*.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*. 1997; 16 (7): 1647-1655.

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): 909-912.

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.

Heslin MJ, Cordon-Cardo C, Lewis JJ, Woodruff JM, Brennan MF. Ki-67 detected by MIB-1 predicts distant metastasis and tumor mortality in primary, high grade extremity soft tissue sarcoma. *Cancer.* 1998; 83 (3): 490-7.

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

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

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): 23-28.

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.

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): 8695-8699.

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

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.

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.

Kowalski LP, Anelli A, Salvajoli JV, Lopes LF. *Manual de Condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia*. São Paulo: Âmbito Editores, 2a edição; 2002.

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.

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.

Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*. 2000; 16 (3): 202-8.

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.

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.

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): 11512-11516.

Lee DK, Chang C. Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88 (9): 4043-54.

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): 1493-1499.

Lin MF, Lee MS, Zhou XW, Andressen JC, Meng TC, Johansson SL, West WW, Taylor RI, Anderson JR, Lin FF. Decreased expression of cellular prostatic acid phosphatase increases tumorigenicity of human prostate cancer cells. *J Urol.* 2001; 166 (5): 1943-50.

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 M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Ide C, Coche E, Weynand B, Desuter G, Hamoir M, Remacle M, Marbaix E. Predictive value of the fraction of cancer cells immunolabeled for proliferating cell nuclear antigen or Ki67 in biopsies of head and neck carcinomas to identify lymph node metastasis: comparison with clinical and radiologic examinations. *Head Neck.* 2003; 25 (4): 280-288.

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.

Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP. Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science.* 2000; 288 (5475): 2379-81.

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.

Magnifico A, Tagliabue E, Ardini E, Casalini P, Colnaghi MI, Menard S. Heregulin beta1 induces the down regulation and the ubiquitin-proteasome degradation pathway of p185HER2 oncoprotein. *FEBS Lett.* 1998; 422 (2): 129-31.

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

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Programas de Controle de Câncer – PRO-ONCO. O problema de câncer no Brasil. Disponível em URL: <http://www.inca.org.br>. (2003 Nov 6).

Mirra AP, Latorre MRDO, Veneziano DB, Incidência do câncer no município de São Paulo, Brasil, 1997-1998, São Paulo: *Registro de Câncer de São Paulo*: 2001.

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.

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.

Nehse G, Tunn S. Androgen and progesterone receptors in oral carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg.* 1994; 22 (2): 114-9.

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.

Nishimoto IN, Pinheiro NA, Rogatto SR, Carvalho AL, de Moura RP, Caballero OL, Simpson A, Kowalski LP. Alcohol dehydrogenase 3 genotype as a risk factor for upper aerodigestive tract cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;130 (1): 78-82.

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): 627-640.

Ojanotko-Harri A, Forssell H, Laine M, Hurttia H, Blauer M, Tuohimaa P. Immunohistochemical detection of androgen receptors in human oral mucosa. *Arch Oral Biol*. 1992; 37 (6): 511-4.

Onodera K, Ichinohasama R, Ooya K. Double malignant neoplasms occurring long after local radiation to the oral mucosa. *Virchows Arch*. 1998; 433 (4): 391-4.

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.

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

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): 1068-1073.

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, 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.

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, 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): 4611-4615.

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.

Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet.* 2003; 33(1): 49-54.

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.

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): 707-715.

Rudolph P, Kellner U, Chassevent A, Collin F, Bonichon F, Parwaresch R, Coindre JM. Prognostic relevance of a novel proliferation marker, Ki-S11, for soft-tissue sarcoma. A multivariate study. *Am J Pathol.* 1997; 150 (6): 1997-2007.

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.

Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.* 1993; 123 (3): 513-22.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182 (3): 311-322.

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.

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.* 1992; 97 (5): 686-91.

Signoretti S, Montironi R, Manola J, Altimari A, Tam C, Bubley 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): 1918-1925.

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. *Oral Oncol.* 2004; *in press.*

Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol.* 1999; 35 (6): 583-9.

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): 177-182.

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

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): 1086-1090.

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 (45): 5173-5181.

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.

Takahashi S, Kamata Y, Tamo W, Koyanagi M, Hatanaka R, Yamada Y, Tsushima T, Takaya S, Fukuda I. Relationship between postoperative recurrence and expression of cyclin E, p27, and Ki-67 in non-small cell lung cancer without lymph node metastases. *Int J Clin Oncol*. 2002; 7 (6): 349-55.

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.

Tejido Sanchez A, Sanchez Chapado M, Rosino Sanchez A, Passas Martinez J, Bethencourt Codes F, Ruiz Ramos P, Leiva Galvis O. PCNA and Ki-67 expression

in locally confined renal adenocarcinoma. Relationship with various histopathologic variables and prognostic significance. *Arch Esp Urol*. 2002; 55 (3): 257-65.

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 T, Aozasa K, Tsujimoto M, Ohsawa M, Uchida A, Aoki Y, Ono K, Matsumoto K. Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas. *Cancer*. 1989; 63 (8): 1607-11.

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.

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, 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.

Vlad LD, Axatidis 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.

Walker DM, Boey G, McDonald LA. The pathology of oral cancer. *Pathology*. 2003; 35 (5): 376-83.

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): 905-912.

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): 5974-5978.

Werkmeister R, Brandt B, Joos U. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol*. 2000; 36 (1): 100-105.

Wilkman TS, Hietanen JH, Malmstrom MJ, Kontinen 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.

Wozniak A, Golusinski W, Kaczmarek E, Kaczmarek J, Kaczmarek J. Prognostic significance of Ki67 and PCNA expression in laryngeal squamous cell carcinoma

(morphometric evaluation of labelling index-L1). *Otolaryngol Pol.* 2002; 4 (56): 437-443.

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): 4164-4174.

Xu W, Mimnaugh E, Rosser MF, Nicchitta C, Marcu M, Yarden Y, Neckers L. Sensitivity of mature ErbB2 to geldanamycin is conferred by its kinase domain and is mediated by the chaperone protein Hsp90. *J Histol Chem.* 2001; 276 (5): 3702-3708.

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.

Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol.* 2002; 20 (1): 189-94.

Zakrzewska JM. Fortnightly review: oral cancer. *BMJ*. 1999; 318 (7190): 1051-4.

Zhou W, Simpson PJ, McFadden JM, Townsend CA, Medghalchi SM, Vadlamudi A, Pinn ML, Ronnett GV, Kuhajda FP. Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res*. 2003; 63 (21): 7330-7.

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.

ANEXO I

**HOSPITAL DO CÂNCER -DEPARTAMENTO DE CABEÇA E PESCOÇO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

1.	I.D.....		<input type="checkbox"/>					
2.	Registro Hospitalar.....		<input type="checkbox"/>					
3.	Bloco AP n° _____							
4.	Idade (anos).....		<input type="checkbox"/>					
5.	Sexo (1) masculino (2) feminino							
6.	Grupo étnico (1) branco (2) não-branco.....							
7.	Tempo de queixa (meses).....		<input type="checkbox"/>					
8.	Localização CID.....		<input type="checkbox"/>					
9.	Tamanho do tumor (cm).....							
10.	T1(1) T2(2) T3(3) T4(4) T5(5).....							
11.	N0(1) N1(2) N2(3) N3(4) NX(5).....							
12.	M0(1) M1(2) MX(3).....							
13.	Metástase no diagnóstico.....							
	M0(0) linfonodos(1) pulmão(2) osso(3) fígado(4) outros(5)_____							
14.	Grau histológico.....		<input type="checkbox"/>					
	Bem diferenciado(1) Moderadamente(2) Pobrememente(3) Indiferenciado(4)							
15.	Data de início do tratamento.....		<input type="checkbox"/>					
16.	Seqüência de tratamento.....		<input type="checkbox"/>					
	Não(0) Cirurgia(1) RXT(2) QT(3)							
17.	Data da cirurgia.....		<input type="checkbox"/>					
	18. Margens cirúrgicas: Livres(1) Comprometida(2).....							
19.	Data do início da RXT.....		<input type="checkbox"/>					
20.	Data do início da quimioterapia.....		<input type="checkbox"/>					
21.	Comprometimento linfonodal							
	a) Total dissecado.....		<input type="checkbox"/>					
	b) Número comprometido.....		<input type="checkbox"/>					
22.	Recidiva/Metástase não(0) local(1) linfonodo(2) distância(4).....							
23.	Linfonodo não(0) ipsilateral(1) contra-lateral(2)							
24.	Distância: M0(0) linfonodos(1) pulmão(2) osso(3) fígado(4) outros(5).....							
25.	Data da metástase ou recidiva.....		<input type="checkbox"/>					
26.	Data da última informação.....		<input type="checkbox"/>					
27.	Situação da última informação.....		<input type="checkbox"/>					
	Vivo sem doença(1) Vivo com doença(2) Morto pela doença(3)							
	Morto durante o tratamento(4) Morto por outras causas(5) Perdido de vista(6)							
28.	Hábito de fumar (1) sim (2) não.....		<input type="checkbox"/>					
	tempo (anos)_____ quantidade _____							
29.	Hábito de beber (1) sim (2) não.....		<input type="checkbox"/>					
	tempo (anos)_____ dose _____							
30.	Índice (%) PCNA:_____							
31.	Intensidade PCNA: negativo (0) fraco(1) moderado(2) forte(3)		<input type="checkbox"/>					
32.	Índice (%) p53:_____							
33.	Intensidade p53: negativo (0) fraco(1) moderado(2) forte(3)		<input type="checkbox"/>					
34.	MMP-2_____							
35.	MMP-9_____							