

EDUARDO BAUML CAMPAGNOLI, CD.

**EXPRESSÃO DA ÁCIDO GRAXO SINTASE, ErbB-2, p27 E Skp2 NA CARCINOGENESE BUCAL INDUZIDA POR 1-ÓXIDO 4-NITROQUINOLINA EM CAMUNDONGOS E EFEITO ANTITUMORAL DO ORLISTAT**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Estomatopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
CÉSAR LATTES  
DESENVOLVIMENTO DE CIÊNCIAS

**PIRACICABA  
2007**

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com o Manual de OCFD 003/03.  
OCFD, 03 de 12 de 2007

Assinatura do Orientador

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA: \_\_\_\_\_  
T/UNICAMP 015e  
V. \_\_\_\_\_ EX. \_\_\_\_\_  
TOMBO FOL. 75795  
PROC. 16P-129-03  
C. \_\_\_\_\_ D. X  
PREÇO 11,00  
DATA 04-03-08  
BIB-ID 425458

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

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

C15e Campagnoli, Eduardo Bauml.  
Expressão da Ácido Graxo Sintase, ErbB-2, p27 e Skp2 na carcinogênese bucal induzida por 1-óxido 4-nitroquinolina em camundongos e efeito antitumoral do Orlistat. / Eduardo Bauml Campagnoli. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: Jacks Jorge Júnior.  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Carcinoma de células escamosas. I. Jorge Júnior, Jacks. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Fatty Acid Sintase, ErbB-2, p27 and Skp2 expression in oral carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide and antitumoral Orlistat effects

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Carcinoma, squamous cell

Área de Concentração: Estomatologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Célia Akemi Kanashiro, Elizabete Brasil dos Santos, Ricardo Della Coletta, Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior

Data da Defesa: 28-08-2007

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 28 de Agosto de 2007, considerou o candidato EDUARDO BAUML CAMPAGNOLI aprovado.

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. JACKS JORGE JUNIOR

  
\_\_\_\_\_  
PROFa. DRa. ELIZABETE BRASIL DOS SANTOS

  
\_\_\_\_\_  
PROFa. DRa. CÉLIA AKEMI KANASHIRO

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. EDGARD GRANER

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. RICARDO DELLA COLETTA

2008 03208

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
CÉSAR LATTES  
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Dedico este trabalho aos meus pais, **Cesar José Campagnoli** e **Ingrid Bauml Campagnoli**, pelo amor, doação em favor de meus sonhos, incentivo e transmissão dos valores morais que foram fundamentais para que eu atingisse mais este objetivo.

A minha noiva, **Karina Regalio**, pelo seu amor, amizade, compreensão, apoio e incentivo dedicados a mim.

A toda a minha **Família**, que mesmo de longe, deram-me força e apoio.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar em todos os momentos da minha vida. Todo o meu amor e devoção.

Aos meus pais, Cesar e Ingrid, a minha noiva, Karina e a toda minha família, pelo apoio, compreensão, incentivo e carinho a mim transmitido em todos os momentos.

Agradeço a Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP, na pessoa do seu Diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, por ter-me proporcionado um crescimento técnico-científico e cultural.

Ao Prof. Dr. Mario Alexandre Coelho Sinhoreti, coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia, pela sua dedicação, apoio, amizade e transmitir diariamente conhecimentos que me permitiram um crescimento tanto científico como pessoal. Também agradeço pela orientação recebida, fundamental para a elaboração e conclusão deste trabalho. Sendo um exemplo de profissional, traduzido por postura simples, ética e competente.

Ao Prof. Dr. Edgard Graner, exemplo de profissionalismo e dedicação que contribuiu de maneira inestimável durante o estudo.

Ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, exemplo de dignidade e trabalho, por incentivar-me no início a minha carreira. Todo o meu respeito e gratidão.

Aos Profs. Drs. Marcio Ajudarte Lopes, Pablo Agustin Vargas, Ricardo Della Coletta, Osvaldo Di Hipólito Júnior, por terem-me ensinado o valor do aprender, a

necessidade de se buscar, a importância das mudanças, a necessidade de começar, a força da perseverança e a humildade.

A Ana Carolina de Mesquita Netto, Lucielma Salmito Soares Pinto e Marco Antônio Carvalho, que além de sua amizade, ajudaram-me de maneira incondicional para a realização desse estudo. Muito obrigado!

Ao amigo Jorge Esquiche Leon pela sua amizade e por compartilhar o conhecimento na área de patologia, contribuindo de maneira fundamental em minha formação científica.

Aos amigos da pós-graduação: Andréia Aparecida da Silva, Francisco Carlos A. Aguiar Júnior, Danyel Elias da Cruz Perez, Fábio A. Ito, Fabio Ornelas Prado, Michele Agostini, Sabrina Daniela da Silva, Dawton Abranches Pulhez, Guilherme Martinez Mata, Lilia Alves Rocha, Patrícia Gemma Strappa Abrahão, Rebeca de Souza Azevedo, Michele Gassen Kellermann, Lays Martin Sobral, Alan Roger dos Santos Silva, Mário José Romanach Gonzales Sobrinho, Luiz Alcindo Monteiro Gueiros, Ademar Takahama Junior, Adriele Ferreira Gouvêa, Maria Fernanda de Souza Setúbal Destro, Carolina Cavalcanti Bitu e Kenia Regina Silva, pelos bons momentos que compartilhamos, pela ajuda que cada um soube prestar ao longo deste trabalho e de minha formação.

Aos cirurgiões-dentistas Rogério de Andrade Elias e Valéria Totti e à funcionária do Orocentro Aparecida Conceição Champion pela companhia, amizade e pelos ensinamentos a mim transmitidos durante o período que estive no Orocentro.

A funcionária Ana Cristina do Amaral Godoy pela sua atenção e disposição em ajudar-me nas reações de imunohistoquímica. Além disso, pela sua amizade e apoio durante todo o curso de pós-graduação.

Agradeço aos funcionários da área de Patologia, Adriano, João, Rosa e Valéria pelo auxílio e colaboração para o desenvolvimento desse trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de algum modo contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

“Cada pessoa em sua existência pode ter duas atitudes: construir ou plantar. Os construtores podem demorar anos em suas tarefas, mas um dia terminam aquilo que estavam fazendo. Então param e ficam limitados por suas próprias paredes. A vida perde sentido quando a construção acaba. Os que plantam sofrem com as tempestades, as estações e raramente descansam. Mas, ao contrário de um edifício, o jardim jamais pára de crescer. E, ao mesmo tempo que exige a atenção do jardineiro, também permite que, para ele, a vida seja uma grande aventura”.

(Paulo Coelho)

## RESUMO

O carcinoma espinocelular de boca é um dos cânceres mais comuns do mundo, logo a compreensão das vias moleculares envolvidas no processo de carcinogênese poderá auxiliar no desenvolvimento de drogas para o tratamento e prevenção deste tipo de neoplasia. FAS é uma das enzimas metabólicas que participam da síntese endógena de ácidos graxos, enquanto ErbB-2 é um receptor de membrana celular responsável pelo crescimento e diferenciação de vários tipos celulares. Já a proteína p27 é inibidora do ciclo celular e Skp2 é uma ubiquitina ligase que atua na ubiquitinação e degradação de p27. Estudos têm demonstrado que a inibição da FAS desencadeia o processo de apoptose em diversas linhagens de células neoplásicas. Recentemente relatou-se que o Orlistat apresenta efeito inibitório sobre a FAS. Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar a expressão de FAS, ErbB-2, p27 e Skp2 em epitélios com displasia leve, moderada, severa e no carcinoma espinocelular quimicamente induzidos, bem como verificar o efeito do Orlistat no processo de carcinogênese bucal. Para tanto, camundongos foram expostos ao 1-óxido 4-nitroquinolina (4NQO) durante 16 semanas e sacrificados ao completarem 16, 18, 20 e 25 semanas. Um dos grupos também recebeu injeção intraperitoneal de Orlistat (240 mg/kg) diária, durante quinze dias. Após o sacrifício dos animais, a língua foi removida, emblocada em parafina e cortes histológicos obtidos. Presença de displasias e neoplasias malignas foram avaliadas em lâminas coradas por hematoxilina e eosina. Reações imunohistoquímicas foram realizadas com os anticorpos: Ki-67 (marcador de proliferação celular), FAS, ErbB-2, p27 e Skp2. O índice de proliferação celular (Ki-67) foi de 26,57%, 22,85%, 26,12% e 23,86% nas áreas de displasia leve, moderada, severa e carcinoma invasivo, respectivamente. O epitélio normal teve índice de proliferação celular de 4,31%. ErbB-2 exibiu aumento na expressão tanto nas áreas displásicas como tumorais, sendo que

ambas apresentaram mais de 50% de células imunomarcadas. Aumento na expressão da FAS diferiu de modo estatisticamente significativo, em relação ao epitélio normal, somente nas áreas com displasia severa e de carcinoma invasivo, embora aumento gradual na expressão desta proteína tenha sido observado durante todo o processo de carcinogênese. A quantidade protéica de p27 aumentou gradualmente durante a carcinogênese, sendo as maiores taxas encontradas nas áreas de displasia severa (57,50% de células imunomarcadas) e carcinoma invasivo (53,55% de células positivas). Para Skp2 verificou-se imunomarcação exclusivamente citoplasmática (Skp2-B), a qual esteve aumentada tanto nas áreas displásicas como tumorais. Os camundongos tratados com Orlistat tiveram área tumoral 67,25% menor do que os animais não tratados. Além disso, houve diminuição na proliferação celular (2,58% de positividade celular), bem como menor número de células imunomarcadas contra as proteínas p27 e Skp2-B. Com base nesses resultados concluiu-se que durante o processo de carcinogênese bucal induzida por 4NQO houve aumento na proliferação celular (Ki-67) e na expressão das proteínas FAS, ErbB-2, p27 e Skp2-B (citoplasmática), sendo que ErbB-2 e Skp2-B tiveram aumento significativo já nos estágios iniciais da carcinogênese. Além disso, o Orlistat apresentou efeito antitumoral e antiproliferativo em carcinomas espinocelulares de língua quimicamente induzidos.

**Palavras-chave:** Carcinoma espinocelular, displasia epitelial, Acido Graxo Sintase, ErbB-2, p27, Skp2, Orlistat.

## **ABSTRACT**

Squamous cell carcinoma of the oral cavity is one of the most common malignant epithelial neoplasms, and a better understanding of its molecular pathways could help the development of new treatment or preventive agents. Several proteins such as Fatty Acid Synthase (FAS), ErbB-2, p27 and Skp2 are involved in the tumorigenesis process. FAS has an enzyme with multiple functions, including the endogenous synthesis of saturated fatty acids. ErbB-2 is a transmembrane receptor that may have a role in cellular growth and differentiation. p27 is a cyclin-dependent kinase inhibitor and plays an important role on the negative regulation of the cell cycle. On the other hand, Skp2 is an ubiquitin ligase that targets p27 for ubiquitination and degradation. Studies have demonstrated that FAS inhibition induces apoptosis in various neoplastic cells and can suppress tumor cell proliferation. It has been demonstrated that Orlistat has anti-proliferative and anti-tumor properties through blocked FAS activity. Therefore, the aim of the present study was to investigate FAS, ErbB-2, p27 and Skp2 expression in the epithelium with chemically-induced dysplasia and squamous cell carcinoma, and to verify the effect of Orlistat on the carcinogenic process. Lesions were induced by 4NQO in the drinking water to C57BL/6 mice during 16 weeks. The animals were sacrificed after 16, 18, 20 and 25 weeks of treatment. One group also received intraperitoneal injection of Orlistat, 240 mg/kg/day, during fifteen days. The tongues were removed and paraffin embedded tissues were cut and stained with hematoxylin and eosin. Dysplastic lesions and squamous cell carcinomas were analyzed in slides stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemistry assays were performed for Ki-67, FAS, ErbB-2, p27 and Skp2. The percentage of cells that reacted with the Ki-67 antibody was 26.57%, 22.85%, 26.12% and 23.86% in areas with mild, moderate, severe dysplasia and invasive carcinoma, respectively. The normal epithelium had low index of cellular proliferation, 4.31%. ErbB-2 showed increase in the expression in dysplastic and tumor areas, for both presented more 50% of positive cells. High expression of FAS was observed in

areas with severe dysplasia and squamous cell carcinoma, although gradual increased was observed during all the carcinogenic process. Expression of p27 protein increased gradually during carcinogenesis and the biggest levels were detected in areas with severe dysplasia (57.50% of immunostaining cells) and invasive carcinoma (53.55% of positive cells). Skp2 immunoexpression was strictly cytoplasmic (Skp2-B), and it was increased in tumoral and dysplastic areas. Lesions of mice treated with Orlistat showed a 67.25% reduction when compared with non-treated animals. Moreover, cellular proliferation was reduced (2.58% of cellular immunostaining), and there were less cells immunostained for p27 and Skp2-B. Therefore dysplastic areas showed increased expression of Ki-67 and high expression of FAS, ErbB-2, p27 and Skp2-B, when compared with normal epithelium. ErbB-2 and Skp2-B had increased expression in the early stages of carcinogenesis. Moreover, Orlistat showed anti-tumoral and anti-proliferative effect in chemically-induced quamous cell carcinomas of the tongue.

**Key words:** Squamous cell carcinoma, dysplasia epithelial, Fatty Acid Synthase, ErbB-2, p27, Skp2, Orlistat.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	- Valores percentuais
$\mu\text{L}$	- Microlitro
$\mu\text{m}$	- Micrômetro
$\mu\text{m}^2$	- Micrômetro quadrado
$^{\circ}\text{C}$	- Graus Celsius
4NQO	- 1-óxido 4-nitroquinolina
CDK	- Quinase dependente de ciclina
CEC	- Carcinoma Espinocelular
DAB	- Diaminobenzidina
DMBA	- 9,10 dimetil 1,2-benzatraceno
DMSO	- Di-metil sulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético ( <i>EthyleneDiamine Tetracetic Acid</i> )
EGF	- Fator de crescimento epidérmico
EGFR	- Receptor para o fator de crescimento epidérmico
EUA	- Estados Unidos da América
FAS	- Ácido graxo sintase ( <i>Fatty Acid Synthase</i> )
kDa	- Quilodaltons
min	- Minuto
ml	- Mililitro
mM	- Milimolar
PBS	- Solução salina tamponada com fosfato ( <i>Phosphate Buffered Salina</i> )
pH	- Potencial hidrogeniônico
RNA	- Ácido ribonucléico
rpm	- Rotação por minuto
Skp2	- Proteína 2 associada a quinase da fase S ( <i>S-phase kinase-associated protein 2</i> ).
TRIS	- 2-amino 2-hidroximetil 1,3-propanediol ( <i>Trishydroxymethylaminomethane</i> )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	05
2.1 Câncer de boca .....	05
2.2 Modelo animal de carcinogênese bucal .....	07
2.3 Acido Graxo Sintase (FAS) .....	11
2.4 ErbB-2 .....	14
2.5 p27 .....	17
2.6 Skp2 ( <i>S-phase kinase-associated protein 2</i> ).....	20
2.7 KI-67 .....	23
2.8 Inibição da FAS e os efeitos celulares .....	25
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 Modelo Animal .....	31
4.2 Preparo da solução de 1-óxido 4-nitroquinolina (4NQO) .....	32
4.3 Preparo da solução de Orlistat e tratamento dos animais .....	33
4.4 Obtenção das amostras .....	33
4.5 Análise histológica .....	34
4.6 Imunohistoquímica .....	36
4.7 Análise das rações imunohistoquímicas .....	38
4.8 Análise estatística .....	39
<b>5 RESULTADOS</b> .....	41
5.1 Modelo animal .....	41
5.2 Análise dos marcadores imunohistoquímicos.....	47
5.3 Efeito do Orlistat .....	61
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	67
6.1 Modelo animal .....	67
6.2 Processo de carcinogênese bucal .....	70
6.3 Efeito do Orlistat .....	78
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	83
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	85
<b>ANEXOS</b> .....	97

# 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer é considerado pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) como um problema de saúde pública de dimensão nacional. Somente para o ano de 2006 estimou-se cerca de 472.050 novos casos desta doença, destacando-se o câncer de boca, com cerca de 13.470 novos casos (Brasil, 2005). O carcinoma espinocelular é o tumor maligno mais freqüente na região de cabeça e pescoço, representando mais de 90% de todos os casos (Epstein *et al.*, 2002; Sanderson & Ironside, 2002; Scully & Felix, 2006), sendo o tabagismo e o etilismo os principais fatores ambientais relacionados com este tipo de neoplasia maligna (Forastiere *et al.*, 2001; Znaor *et al.*, 2003; Neville *et al.*, 2004).

Apesar de todo o avanço científico e tecnológico na área oncológica nas últimas décadas, a grande parte dos casos de câncer na cabeça e pescoço é diagnosticada em estágios avançados, o que torna o tratamento mais complexo e desfigurante e gera altas taxas de mortalidade (Forastiere *et al.*, 2001; Conway *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2003). Infelizmente, somente o exame clínico e o estudo histopatológico não são suficientes para prever o real potencial de malignização de uma lesão cancerizável ou o comportamento biológico do tumor (Küstner *et al.*, 2004). Portanto, novos métodos de detecção precoce e avaliação tumoral, que permitam determinar o comportamento biológico das lesões, necessitam ser desenvolvidos (Kim & Califano, 2004).

Embora o carcinoma espinocelular de boca, geralmente, seja precedido por áreas displásicas, os eventos moleculares envolvidos na progressão e desenvolvimento deste tumor são pobremente compreendidos (Krontiras *et al.*, 1999). Várias proteínas têm sido estudadas para melhor compreensão das vias moleculares envolvidas no processo de carcinogênese bucal, dentre elas: a enzima Ácido Graxo Sintase (FAS), ErbB-2, p27 e Skp2. No entanto, a participação dessas proteínas no processo de carcinogênese bucal ainda não está bem definida e não há nenhum estudo realizado, até o presente momento, que

correlacione a ação dessas proteínas nas áreas de displasia leve, moderada, severa e carcinoma invasivo em modelo animal.

A FAS é a enzima responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados (Kuhajda *et al.*, 2000; Brink *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2004) e se encontra superexpressa em diversas neoplasias malignas, contribuindo para comportamento biológico mais agressivo quando comparado aos tumores que apresentam níveis normais desta enzima (Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Rossi *et al.*, 2003; Baron *et al.*, 2004; Agostini *et al.*, 2004). A atividade da FAS está de alguma maneira ligada à progressão do ciclo celular nas células tumorais, pois síntese adicional de ácidos graxos parece ser necessária à biogênese das membranas das células em rápida divisão mitótica (Hannun & Obeid, 2002). Vários estudos têm demonstrado que a inibição da FAS pode interferir na proliferação celular e induzir as células a entrarem em apoptose (Guo *et al.*, 2003; Knowles *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005b). A cerulenina, o C75 e o Orlistat apresentam efeito inibitório sobre a FAS. Kridel *et al.* (2004) demonstraram as propriedades antitumorais e antiproliferativas do Orlistat, por atuar inibindo a FAS, em linhagens de células de câncer de próstata.

ErbB-2 é um receptor transmembrânico de superfície pertencente à família ErbB, o qual regula o crescimento, a diferenciação e a migração celular (Kolibaba & Druker, 1997). Em vários tipos de cânceres há alta expressão desta proteína (Signoretti *et al.*, 2000; Yarden, 2001), funcionando como oncogene (Kumar-Sinha *et al.*, 2003).

Já a proteína p27 é inibidora específica da quinase dependente de ciclina 2 (CDK2), impedindo a progressão do ciclo celular e protegendo os tecidos da proliferação excessiva (Polyak *et al.*, 2004). Diversos estudos têm demonstrado redução nos níveis da proteína p27 em neoplasias malignas, inclusive no carcinoma espinocelular de boca (Kudo *et al.*, 1998). A diminuição nos níveis protéicos de p27 geralmente está associada ao aumento quantitativo da proteína Skp2, que atua reconhecendo, ubiquitinizando e degradando a proteína p27 (Kitajima *et al.*, 2004; Radke *et al.*, 2005). Pesquisas atuais têm considerado a

superexpressão de Skp2 e a diminuição nos níveis protéicos de p27 como importantes fatores relacionados ao prognóstico e a sobrevida de pacientes com câncer (Shintani *et al.*, 2003; Kudo *et al.*, 2005; Shapira *et al.*, 2005).

Portanto, este estudo foi realizado com o objetivo de verificar a participação das proteínas FAS, ErbB-2, p27 e Skp2, bem como o efeito do Orlistat, na carcinogênese bucal.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Câncer de boca

A incidência do câncer cresce no Brasil, como em todo o mundo, num ritmo que acompanha o envelhecimento populacional decorrente do aumento da expectativa de vida. É um resultado direto das grandes transformações globais das últimas décadas, que alteraram a situação de saúde dos povos pela urbanização acelerada, novos modos de vida e novos padrões de consumo (Brasil, 2006).

Atualmente, as neoplasias malignas representam a segunda causa de morte no Brasil (12,7%), perdendo somente para as doenças do sistema circulatório (Brasil, 2003). Para o ano de 2006 estimou-se a ocorrência de 472.050 novos casos de cânceres, o que corresponde a 2 casos novos por ano para cada 1.000 habitantes (Brasil, 2005). Os cânceres mais incidentes, à exceção das lesões de pele não-melanoma, são os cânceres de próstata, pulmão e estômago no sexo masculino; mama, colo do útero e intestino no sexo feminino (Brasil, 2006).

As neoplasias malignas bucais estão entre os 10 tipos mais comuns de cânceres no mundo, representando cerca de 3% do total (Scully & Felix, 2006). No Brasil esse tipo de neoplasia maligna corresponde ao sexto tipo mais comum de câncer em indivíduos do sexo masculino e ao oitavo em pessoas do sexo feminino, sendo estimados 13.470 novos casos somente para o ano de 2006. As maiores incidências são encontradas nos estados de São Paulo (4.330 novos casos), Rio de Janeiro (2.050 novos casos), Paraná (1.080 novos casos), Minas Gerais (1.030 novos casos) e Rio Grande do Sul (1.020 novos casos) (Brasil, 2005).

O tumor maligno mais freqüente na região de cabeça e pescoço é o carcinoma espinocelular, representando mais de 90% de todos os casos (Ogden &

Macluskey, 2000; Epstein *et al.*, 2002; Sanderson & Ironside, 2002; Scully & Felix, 2006). O carcinoma espinocelular de boca é mais freqüente em homens, acima dos 40 anos de idade, geralmente com histórico de consumo excessivo de álcool e tabaco (Forastiere *et al.*, 2001; Znaor *et al.*, 2003; Neville *et al.*, 2004).

O tabaco, se fumado ou mascado, libera uma mistura complexa com cerca de pelo menos 50 agentes carcinogênicos, dentre eles os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como: o benzilpireno, nitrosaminas, aldeídos e aminas aromáticas (Scully & Felix, 2006). Tanto os agentes de natureza química, como os agentes físicos e biológicos modificam o ácido desoxirribonucléico (DNA), ocasionando mutações, rupturas cromossômicas e recombinações genéticas (Elias *et al.*, 2002). O acúmulo dessas alterações, particularmente nos genes que regulam o crescimento, diferenciação e morte celular; a estabilidade e reparo do DNA; a imunidade celular e humoral; podem resultar ou contribuir para o desenvolvimento do câncer (Scully, 1993).

O processo de carcinogênese bucal é multifatorial e requer o acúmulo de alterações genéticas nas células epiteliais. Estudos estatísticos de aspectos moleculares sugerem a ocorrência de 6 a 10 alterações genéticas para a transformação maligna da mucosa bucal (Califano *et al.*, 2000). Logo, o desenvolvimento do câncer bucal é um processo que requer múltiplas etapas, as quais incluem mudanças como hiperplasia, lesões cancerizáveis com displasias (leucoplasia e eritroplasia) e finalmente o tumor. 70% dos carcinomas espinocelulares de boca são derivados de lesões cancerizáveis, porém somente 8% a 10% destas tornam-se malignas (Kanojia & Vaidya, 2006).

Reconhece-se que o exame clínico e o estudo histopatológico rotineiro não são suficientes para prever o real potencial de malignização de lesões com áreas displásicas (Küstner *et al.*, 2004). É tarefa complexa e muitas vezes frustrante diferenciar as displasias epiteliais, presentes nas leucoplasias e eritroplasias, de um carcinoma invasivo precoce, uma vez que o diagnóstico varia de acordo com a subjetividade e a experiência do patologista (Nauta *et al.*, 1995; Van der Waal & Axell, 2002).

Por essa razão, numerosas investigações tentam empregar, de forma seletiva, exames mais específicos que permitam detectar as alterações celulares no nível molecular (Küstner *et al.*, 2004).

Logo, uma melhor compreensão das vias moleculares envolvidas no processo de tumorigênese poderá ser usada para aumentar a eficácia clínica das terapias empregadas (Kim & Califano, 2004). Além disso, se marcadores moleculares específicos forem identificados em lesões cancerizáveis, os quais estão freqüentemente presentes na transformação, poderão ser usados para prevenir o câncer antes que ele se desenvolva, por meio terapêutico ou por quimioprevenção (Küstner *et al.*, 2004; Kanojia & Vaidya, 2006).

## **02.2 Modelo animal de carcinogênese bucal**

Para melhor compreensão do processo de carcinogênese bucal, bem como o desenvolvimento de novos agentes quimiopreventivos, novas pesquisas devem ser realizadas. Logo modelos animais são necessários para a realização desses estudos (Everson, 1981, Nauta *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 2004, Suzuki, 2006). Numerosos agentes químicos carcinogênicos, dentre eles: a brasa do alcatrão, o 20 metil-colantreno (20MC), 3,4-benzilpireno (3,4 BP), 9,10 dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) e 1-óxido 4-nitroquinolina (4NQO); têm sido usados na carcinogênese bucal experimental (Kanojia & Vaidya, 2006; Sioga *et al.*, 2006).

Everson (1981) considerou dois modelos animais apropriados para o estudo da carcinogênese bucal, o primeiro utilizando DMBA na mucosa jugal de *hamster* e o segundo pincelando o carcinógeno 4NQO no palato de ratos. O autor afirma que nenhum dos modelos é ideal e ambos apresentam vantagens e desvantagens.

O DMBA é um dos carcinógenos mais utilizados na indução do câncer de boca, entretanto, apresenta a desvantagem de ser irritante local e provocar resposta inflamatória, necrose e esfoliação epitelial; o que dificulta o estudo de

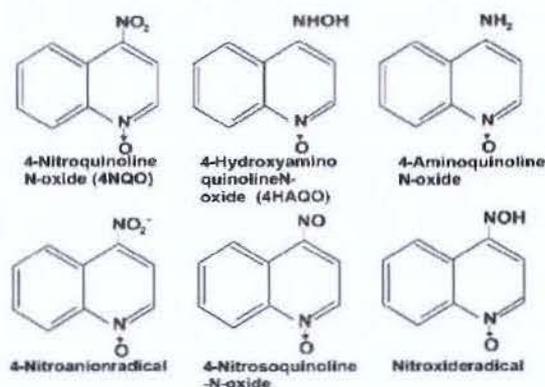
lesões iniciais de carcinomas espinocelulares na mucosa bucal (Nauta *et al.*, 1996). Além disso, o DMBA utilizado na “bolsa” presente na mucosa jugal de *hamster* não é um modelo animal representativo do processo de carcinogênese bucal humana por diversas razões, dentre elas: a “bolsa” não está sujeita a influência ambiental usualmente presente na boca; não há contraparte anatômica no ser humano; o epitélio é mais fino em relação a outras partes da mucosa bucal; o local é imunologicamente privilegiado e o DMBA induz a formação de lesões inicialmente papilomatosas, característica incomum no ser humano (Wong & Wilson, 1983; Nauta *et al.*, 1995).

Já o 1-óxido 4-nitroquinolina (4NQO), carcinógeno sintético solúvel em água, é considerado o melhor carcinógeno para induzir o processo de carcinogênese bucal em ratos ou camundongos. Tal fato deve-se às semelhanças histológicas e moleculares presentes nas lesões quimicamente induzidas, com o processo de carcinogênese humana. Portanto, atualmente o 4NQO é utilizado em estudos que visam desenvolver biomarcadores para o diagnóstico precoce do câncer de boca (Kanojia & Vaidya, 2006).

O potencial carcinogênico do 4NQO foi observado pela primeira vez por Nakahara *et al.* (1957), que notou o desenvolvimento de câncer de pele decorrente do uso desse agente químico, o qual havia sido inicialmente desenvolvido como quimioterápico.

O 4NQO exerce potente *stress* oxidativo intracelular, resultando em produtos metabólicos, principalmente moléculas de oxigênio reativo, que se ligam ao DNA, predominantemente nos resíduos de guanina, induzindo mutações e quebras na fita desse ácido nucléico. Além disso, causa a substituição de adenosinas por guanosinas durante a formação do DNA. As injúrias desencadeadas pelo 4NQO são similares ao dano gerado pelos carcinógenos presentes no tabaco, o qual é o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer bucal (Tang *et al.*, 2004; Kanojia & Vaidya, 2006). Nauta *et al.* (1995) compararam as características histológicas das displasias epiteliais humanas com as displasias quimicamente induzidas em ratos, os quais tiveram o

palato exposto ao 4NQO três vezes por semana durante doze semanas. Os autores observaram várias similaridades entre as displasias humanas e as encontradas nos animais e concluíram que este modelo experimental é apropriado para o estudo do processo de carcinogênese bucal, bem como, para avaliar novas modalidades de tratamento.



**Figura 01:** Representação esquemática da estrutura do 4NQO e os seus derivados metabólicos envolvidos no processo de carcinogênese bucal.

**Fonte:** Kanojia & Vaidya (2006).

Sioga *et al.* (2006) avaliaram as mudanças ultra-estruturais ocorridas durante o processo de carcinogênese induzida por 4NQO em palato de ratos e verificaram a influência da saliva (quando presente ou não) durante esse processo. Os achados ultra-estruturais e histológicos confirmaram que o processo de malignização é gradativo, iniciando com hiperquetarização e finalizando em carcinoma espinocelular invasivo. Aumento no espaço intercelular, principalmente nas células da camada basal; diminuição gradual no número de hemidesmossomos e desmossomos; aumento na quantidade de tonofilamentos; aumento gradual no tamanho nuclear, nucléolos mais evidentes e descontinuidade da lâmina basal foram observados no transcorrer do processo de malignização. Estes autores também observaram que o aparecimento das alterações acima mencionadas ocorriam mais cedo nos animais com hipossalivação do que em animais com fluxo salivar normal. Logo, concluíram que a saliva possui substâncias que retardam, mas não impedem a indução do tumor por 4NQO.

Liu *et al.* (1999) pesquisaram modelos animais para a carcinogênese bucal, nos quais as características histológicas e imunológicas fossem similares ao que ocorre no ser humano. Para tanto, administraram 4NQO a 0,002% na água de beber dos ratos durante 9, 13 e 16 semanas e acompanharam esses animais até totalizarem 32 semanas. Durante o processo de carcinogênese notaram áreas de leucoplasia, erosão e úlceras no dorso da língua dos animais expostos ao 4NQO. Os cortes histopatológicos revelaram áreas de hiperplasia epitelial, displasia (leve, moderada, severa), carcinoma *in situ* e carcinomas espinocelulares invasivos bem diferenciados. A maior incidência de carcinomas foi encontrada em animais que receberam 4NQO por 16 semanas (77,8%). Os autores concluíram que o uso de 4NQO administrado juntamente com a água é um procedimento seguro para obtenção de lesões cancerizáveis e tumores, sendo o processo de carcinogênese morfológicamente e histologicamente similar ao do ser humano.

Tang *et al.* (2004) compararam dois métodos de indução da carcinogênese bucal através do 4NQO, pincelando o agente carcinogênico e administrando-o na água de beber dos animais, bem como testaram duas concentrações diferentes do carcinógeno. Os autores observaram que a administração do 4NQO (100µg/ml) juntamente com a água de beber durante 16 semanas e mais 12 semanas de acompanhamento, foi capaz de induzir carcinomas espinocelulares em todos os camundongos analisados, tanto na língua como no esôfago. O estudo exibiu que os animais tratados com 4NQO por 16 semanas apresentaram mudanças na expressão das citoqueratinas 1 e 14; maior proliferação celular (determinada pela incorporação de bromodeoxiuridina - BrdU); redução na expressão do inibidor do ciclo celular p16 e aumento do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Os resultados indicaram que este modelo animal simula em muitos aspectos o processo de carcinogênese humana, tanto em boca como em esôfago.

Outros estudos, também empregaram esse modelo animal, porém com variações no tempo e na concentração de 4NQO utilizada, no entanto, todos comprovaram a eficácia do 4NQO na indução da carcinogênese bucal (Tanaka *et al.* 1994; Li, 2000; Niwa *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2006; Zhang *et al.* 2006).

### 02.3 ÁCIDO GRAXO SINTASE (FAS)

A Ácido Graxo Sintase (*Fatty Acid Synthase* – FAS) é a enzima metabólica responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados de cadeia longa a partir dos substratos de carbono acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda *et al.*, 2000; Chirala *et al.*, 2001; Brink *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2004). Os ácidos graxos produzidos participam na composição das membranas celulares, atuam como hormônios ou mensageiros intracelulares e são formas de armazenamento de energia no organismo (Chirala *et al.*, 2003; Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Além disso, os produtos sintetizados pela FAS, especificamente o palmitato e estearato, servem como substrato para construção dos esfingolipídios, ceramidas e glicolipídios necessários à progressão da divisão celular, formação de estruturas cerebrais e funções neurológicas (Chirala *et al.*, 2003).

Do ponto de vista estrutural, a FAS é um homodímero formado por duas cadeias polipeptídicas longas, com massa molecular de aproximadamente 250 kDa. Estão presentes sete sítios catalíticos distribuídos da extremidade amino-terminal em direção à carboxil-terminal na seguinte ordem:  $\beta$ -cetoacil sintase, acetil-CoA e/ou malonil-CoA transacilases,  $\beta$ -hidroxiacil desidratase, enoil redutase,  $\beta$ -cetoacil redutase, proteína carregadora de acil (ACP) e tioesterase. O sítio tioesterase localizado na região carboxil-terminal promove a hidrólise do palmitato, o qual é liberado como molécula de ácido graxo recém sintetizado (Jayakumar *et al.*, 1995; Brink *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003).

A FAS é pouco expressa ou mesmo não expressa na maioria dos tecidos humanos normais, pois a maior parte dos ácidos graxos utilizados nestes tecidos são provenientes da dieta (Kuhajda *et al.*, 2000). No entanto, no fígado, no tecido adiposo e na mama durante o período de lactação, a produção de ácidos graxos através da via endógena é importante, ocasionando elevação na expressão dessa enzima anabólica (Brink *et al.*, 2002; Chirala *et al.*, 2003).

Mendes *et al.* (1953) foram os primeiros autores a relatarem aumento na síntese de ácidos graxos nos tecidos tumorais. Esse achado foi confirmado por

Weiss *et al.* (1986), os quais demonstraram ser a biossíntese endógena responsável pela maior parte dos ácidos graxos em células malignas, independentemente do suplemento nutricional.

Apesar de todas as evidências sugerindo que a síntese endógena de ácidos graxos seja um processo essencial para a sobrevivência e proliferação das células neoplásicas, não se conhece até o presente momento qual o mecanismo biológico envolvido. A atividade da FAS está de alguma maneira ligada à progressão do ciclo celular nas células tumorais, pois síntese adicional de ácidos graxos parece ser necessária para biogênese das membranas celulares em células com rápida divisão mitótica (Hannun & Obeid, 2002).

Níveis elevados de FAS já foram identificados nas neoplasias malignas de: mama (Wang *et al.*, 2001), ovário (Alo *et al.*, 2000), próstata (Rossi *et al.*, 2003), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), intestino (Visca *et al.*, 1999), melanoma (Innocenzi *et al.*, 2003) e sarcomas de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003). De modo geral, os tumores que expressam grandes quantidades de FAS apresentam comportamento biológico mais agressivo em relação àqueles que possuem níveis normais, isto porque, a atividade da FAS proporciona vantagens seletivas ao crescimento celular (Baron *et al.*, 2004). Zhang *et al.* (2005) destacaram que as células tumorais elaboram mediadores lipídicos que possuem efeitos autócrinos e/ou parácrinos, afetando o comportamento tumoral.

A progesterona estimula a expressão da FAS em linhagens celulares de câncer de mama, por outro lado, andrógenos e o fator de crescimento epidérmico (EGF) aumentam a expressão e a atividade da FAS em linhagem celular de câncer de próstata (LNCaP) (Swinnen *et al.*, 1997; Lacasa *et al.*, 2001). Esses estudos demonstram o papel dos hormônios na regulação da FAS. Kumar-Sinha *et al.* (2003) descreveram que o gene codificador da FAS é regulado por ErbB-2 em células derivadas de câncer na mama.

Nemoto *et al.* (2001) encontraram em 92,9% dos casos de displasia esofágica e 96,5% dos carcinomas espinocelulares de esôfago, positividade para

expressão citoplasmática da FAS e sugeriram que o aumento nos níveis citoplasmáticos dessa enzima pode ser evidenciado já nos estágios precoces da carcinogênese esofágica. Entretanto, a alta expressão da FAS não apresentou nenhuma correlação com as características clínico-patológicas e com o prognóstico dos pacientes com câncer esofágico.

Krontiras *et al.* (1999) foram os primeiros autores a estudar a expressão de FAS em carcinomas espinocelulares de boca. Para tanto, os pesquisadores selecionaram 56 casos de carcinomas em língua e por meio da imunohistoquímica verificaram a presença ou não da enzima FAS. Além disso, avaliaram áreas de displasias e de tecido normal adjacentes ao tumor. Os autores observaram expressão aumentada da FAS tanto nos carcinomas como nas áreas displásicas, e concluíram que o aumento na expressão pode ser considerado como marcador para mudanças neoplásicas precoces, enquanto a diminuição na sua expressão estaria relacionada à perda de diferenciação tumoral.

Guo *et al.* (2003) verificaram o efeito da inibição da FAS pela cerulenina em células de carcinoma espinocelular de boca e mucosa bucal normal. A cerulenina foi capaz de inibir significativamente a atividade da FAS, principalmente 4 horas após a exposição à droga, sendo os efeitos mais marcantes nas linhagens celulares de carcinoma em comparação às células de mucosa normal. Baseado nesses achados os autores concluíram que a FAS pode ser um alvo na terapia antineoplásica.

Agostini *et al.* (2004) avaliaram a produção de FAS e de moléculas envolvidas na sua regulação em quatro linhagens celulares provenientes de carcinomas espinocelulares de boca. Os resultados revelaram diferentes quantidades de FAS nas quatro linhagens estudadas, além disso, o receptor para o fator de crescimento epidérmico (EGFR) e ErbB-2 foram expressos em grandes quantidades em todas as linhagens.

Silva *et al.* (2004) analisaram 62 casos de carcinoma espinocelular da região de cabeça e pescoço e verificaram aumento simultâneo na expressão de FAS e ErbB-2 em 70% dos casos, sugerindo que ErbB-2 possivelmente regula a

expressão de FAS nesses tumores. Outro achado importante, desse estudo, é que a co-expressão dessas proteínas indicou melhor prognóstico.

Apesar das evidências experimentais e clínicas apontando FAS como enzima importante na patogênese de neoplasias malignas, Almeida *et al.* (2005) observaram expressão aumentada dessa enzima em processos proliferativos de natureza não neoplásica, como na Fibromatose Gengival Hereditária. Esses autores constataram o bloqueio da proliferação de fibroblastos normais e de fibroblastos derivados da fibromatose gengival hereditária, quando se usou inibidor da FAS (cerulenina).

A cerulenina e o C75, inibidores da atividade da FAS, produzem rápida e significativa inibição da replicação do DNA e, conseqüentemente, da progressão da fase S em células derivadas de neoplasias malignas humanas, culminando com a morte celular por apoptose (Li *et al.*, 2001). Dados da literatura demonstram que linhagens celulares derivadas de carcinoma espinocelular bucal com superexpressão de FAS, quando submetidas ao tratamento com cerulenina adicionada ao meio de cultura, tiveram redução drástica na proliferação celular e aumento no número de células em apoptose (Agostini *et al.*, 2004).

Portanto, a atividade biológica da FAS torna-a um possível alvo terapêutico contra diversos tipos de câncer, uma vez que está diretamente ligada a síntese de ácidos graxos necessários à proliferação celular (Kuhajda *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2003; Kumar-Sinha *et al.*, 2003).

## **02.4 ErbB-2**

A família ErbB é composta por quatro membros, ErbB-1, ErbB-2, ErbB-3 e ErbB-4, todos são receptores de membrana citoplasmática e regulam o crescimento, diferenciação e migração de vários tipos celulares (Kolibaba & Druker, 1997). Todos possuem em comum domínio extracelular de ligação, domínio transmembrânico e domínio citoplasmático com atividade de tirosina-

tumores apresentavam marcação citoplasmática para ErbB-2, porém ao correlacionar esses dados com os parâmetros clinico-patológicos ou com a sobrevida dos pacientes, nenhuma relação foi identificada.

Hou *et al.* (1992) analisaram a expressão de ErbB-2 em 15 displasias leves, 14 displasias moderadas, 20 displasias severas e 21 carcinomas de boca. Os resultados indicaram que com a aquisição de um fenótipo maligno há aumento progressivo na expressão de ErbB-2, podendo este receptor ter sua expressão alterada já nos estágios iniciais do processo de carcinogênese.

Werkmeister *et al.* (1999) estudaram as aberrações nos oncogenes ErbB-1 e ErbB-2 em 13 leucoplasias bucais sem a presença histológica de displasias e verificaram presença de aberrações para ErbB-1 (4 deleções e 4 ampliações) em oito casos e deleções para ErbB-2 em dois casos. Os autores concluíram que aberrações genéticas em ErbB-1 e ErbB-2 podem estar associadas à mucosa bucal histologicamente normal, sendo estas importantes no processo de carcinogênese bucal.

Werkmeister *et al.* (2000) analisaram 85 amostras de mucosa bucal histologicamente normais obtidas em área adjacentes ao tumor e encontraram em 9,4% dos casos deleções e em 8,2% ampliações para o gene ErbB-2, confirmando o conceito de cancerização em campo. Esses autores também demonstraram que 20,2% dos pacientes com câncer bucal exibiam amplificação para ErbB-1 e 14,7% para ErbB-2. A amplificação do gene ErbB-2 no tecido tumoral apresentou relevância clínica, pois estava correlacionada com recorrência precoce do tumor ou metástase.

Küstner *et al.* (2004) afirmaram que o aumento na expressão de ErbB-2 pode indicar progressão do processo de carcinogênese bucal mesmo sem evidências clínicas.

Silva *et al.* (2004) relataram acentuada marcação em membrana citoplasmática nas áreas de epitélio “normal” adjacentes ao tumor e em áreas tumorais bem diferenciadas, ao passo que, marcação exclusivamente

citoplasmática foi observada em áreas mais indiferenciadas dos carcinomas espinocelulares de boca analisados.

Aguiar *et al.* (2007) avaliaram 27 casos de carcinomas espinocelulares de boca com recorrência precoce e 54 tumores que não apresentaram recorrência. Os autores encontraram marcação em membrana celular em 77,8% dos casos que tiveram recorrência precoce e em 83,3% dos casos que não houve recorrência. A marcação citoplasmática para ErbB-2 foi verificada em 37% dos casos com recorrências precoces, principalmente em áreas pouco diferenciados, e 42,6% dos casos de carcinoma espinocelular de boca que não recorreram. Portanto, os autores não observaram diferenças estatisticamente significativas entre a imunomarcação para ErbB-2 em carcinomas espinocelulares de boca que recorreram precocemente e os que não recorreram.

## 02.5 p27

A proliferação de células neoplásicas está intimamente relacionada às anormalidades nos fatores que regulam o ciclo celular, sendo muitas vezes a atividade das quinases dependentes de ciclinas (CDKs) responsáveis pelo controle desse ciclo em células eucariontes. A atividade das quinases dependentes de ciclinas (CDKs) é regulada pela associação com as ciclinas e pela fosforilação e desfosforilação da subunidade catalítica. No entanto, inibidores das CDKs regulam negativamente o complexo Ciclina/CDKs, impedindo a progressão do ciclo celular (Massagué, 2004; Swanton, 2004).

Os inibidores de CDKs pertencem a duas grandes famílias, Ink4 e Cip/Kip, sendo classificados de acordo com as suas propriedades estruturais e funcionais. Na família dos Cip/Kip estão incluídas as proteínas p21, p27 e p57, as quais inibem especificamente a atividade da CDK2 por ligar-se aos complexos Ciclina-E/cdk2 e Ciclina-A/cdk2 (Polyak *et al.*, 1994; Toyoshima & Hunter, 1994;

Massagué, 2004). Portanto, a proteína p27 inibe o ciclo celular na fase G<sub>1</sub>, protegendo os tecidos da proliferação excessiva (Polyak *et al.*, 1994).

Em células quiescentes, os níveis de p27 são geralmente altos (Blain *et al.*, 2003), por outro lado, quando as células entram no ciclo celular as proteínas da família Cip/Kip são destruídas pelos proteossomos num processo dependente da proteína Skp2, a qual é responsável pela ubiquitinação e degradação de p27 (Schrumpp *et al.*, 1996; Loda *et al.*, 1997; Kudo *et al.*, 2005).

A concentração da proteína p27 aumenta com o contato entre as células (célula-célula), carência de soro (células em cultura) e na presença do Fator de Crescimento Transformante (TGF- $\beta$ ), por outro lado, diminui com estímulos mitogênicos (Swanton, 2004). No entanto, os níveis de RNA<sub>mensageiro</sub> para a proteína p27 não se alteram durante a progressão do ciclo celular. O aumento nos níveis protéicos de p27 em células quiescentes deve-se a diminuição nas taxas de degradação, portanto o nível celular de p27 é regulado principalmente pelo processo de proteólise dependente de ubiquitina (Pagano *et al.*, 1995).

Deleções homozigóticas para p27 é evento raro em tumores humanos. Contudo, ratos heterozigóticos, com deleção em um dos alelos para o gene do p27, ficaram mais propensos ao desenvolvimento de tumores desencadeados por carcinógenos ou radiação, isso indica que cópias funcionais de ambos genes são requeridas para a supressão do desenvolvimento tumoral (Swanton, 2004).

Já foi observada relação entre a quantidade reduzida da proteína p27 e o pior prognóstico em neoplasias malignas, dentre elas: câncer de cólon uterino, mama, próstata, bexiga, pulmão, fígado, laringe, ovário, melanoma e estômago (Florenes *et al.*, 1998, Lloyd *et al.*, 1999; Tsihlias *et al.*, 1999; Slingerland & Pagano, 2000; Philipp-Staheli *et al.* 2002; Goto *et al.*, 2005). A concentração da proteína p27 também está correlacionada com o grau de diferenciação tumoral, pois tumores pobremente diferenciados e altamente invasivos apresentam baixas concentrações dessa proteína (Catzavelos *et al.*, 1997; Porter *et al.* 1997).

Vários estudos também demonstraram redução nos níveis da proteína p27 em carcinomas espinocelulares de boca. A taxa de redução variou de 35,9% a

87%, sendo as maiores reduções correlacionadas com piores prognósticos (Kudo *et al.*, 1998; Fujieda *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1999; Mineta *et al.*, 1999; Venkatesan *et al.*, 1999; Kuo *et al.*, 2002; Shintani *et al.*, 2002).

Choi *et al.* (2003) observaram que a proteína p27 estava principalmente expressa em ilhas celulares bem diferenciadas do carcinoma espinocelular de boca, por outro lado, a expressão era muito variável em áreas pobremente diferenciadas. Baseado nos achados, esses autores sugeriram que a perda da expressão de p27 está associada com alta proliferação e pobre diferenciação celular em carcinomas espinocelulares de boca.

Fillies *et al.* (2007) analisaram 192 carcinomas espinocelulares de boca por meio de imunohistoquímica e não encontraram nenhuma correlação entre a expressão de p27 e a taxa de sobrevida total dos pacientes. No entanto, no subgrupo de pacientes com comprometimento linfonodal a expressão aumentada de p27 estava associada a melhores taxas de sobrevida.

Kitajima *et al.* (2004) estudaram seis linhagens de células de carcinoma espinocelular humano e verificaram alta expressão da proteína p27 em uma delas (Ho-1-N-1). Essa alta expressão de p27 ocorreu devido à baixa expressão de Skp2 e Cks1, pois quando houve transfecção dos genes Skp2 e Cks1 na linhagem Ho-1-N-1 a expressão de p27 caiu drasticamente.

Pulhez (2007) ao comparar a expressão de p27 em carcinomas espinocelulares de boca, lábio inferior e pele, encontrou marcação mais elevada nos casos de carcinoma de pele e lábio inferior quando comparado ao de boca. Segundo o autor, entre outros fatores, a forma de degradação de p27 poderia ocorrer de forma mais eficiente nos carcinomas intrabucais quando comparados aos carcinomas de lábio inferior e pele, refletindo em comportamentos clínicos diferentes.

Em lesões displásicas, os níveis protéicos de p27 diminuem à medida que aumenta a severidade das displasias, até se transformarem em carcinomas, sendo a redução observada já nos estágios iniciais da carcinogênese (Choi *et al.*, 2003; Kudo *et al.*, 2005).

A proteína p27 localiza-se no núcleo da célula, no entanto, já há relatos de sua localização citoplasmática. Isto se deve ao fato dessa proteína ser fosforilada no resíduo 157 da treonina (Thr), impedindo a sua entrada no núcleo (Liang *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002; Viglietto *et al.*, 2002). Entretanto não tem sido relatada expressão citoplasmática de p27 em carcinomas espinocelulares de boca (Kudo *et al.*, 2005).

Atualmente a proteína p27 é considerada um importante marcador tumoral de prognóstico. A restauração dos níveis de p27 (por inibição de sua degradação) pode ter efeito clínico benéfico no tratamento de alguns carcinomas, ou seja, poderá ser mais uma arma na terapia contra o câncer (Katner *et al.*, 2002; Blain *et al.*, 2003; Kitajima *et al.*, 2004; Kudo *et al.*, 2005).

## **02.6 Skp2 (*S-phase Kinase-associated Protein 2*)**

A ubiquitinação de uma proteína é um processo altamente organizado e envolve a ação de três enzimas, a ativadora de ubiquitina (E1), a conjugadora de ubiquitina (E2) e a ligase de ubiquitina (E3). Essa cascata enzimática resulta na fixação da cadeia de poliubiquitina sob resíduos específicos de lisina, desencadeando um sinal para degradação das proteínas pelo proteossomo 26S (Radke *et al.*, 2005). O complexo SCF representa uma classe de enzimas E3 que contém quatro subunidades: Skp1, culina, uma das muitas proteínas F-box e Rco1 ou Rbx1 (Bloom & Pagano, 2003). O exato número de complexos SCF permanece ainda desconhecido, uma vez que a existência de várias culinas e as várias proteínas F-box permitem inúmeros complexos SCF (Patton *et al.*, 1998).

Skp2 é uma proteína F-box, considerada ligase de ubiquitina, atuando como subunidade do complexo SCF<sup>Skp2</sup> e é responsável pelo reconhecimento, ubiquitinação e degradação da proteína p27 (Ganiatsas *et al.*, 2001; Gstaiger *et al.*, 2001; Kitajima *et al.*, 2004; Radke *et al.*, 2005). O cerne do complexo SCF está localizado no citoplasma até a expressão da proteína Skp2, nas fases tardias de

G1. Com a formação do complexo SCF<sup>Skp2</sup> ocorre a entrada no núcleo e a ubiquitinação de proteínas específicas (Lisztwan *et al.*, 1998).

O complexo SCF<sup>Skp2</sup> também tem sido implicado na ubiquitinação de outras proteínas reguladoras do ciclo celular, incluindo a ciclina E, a ciclina D e o E2F-1 (Marti *et al.*, 1999; Nakayama *et al.*, 2000; Ganiatsas *et al.*, 2001).

No epitélio normal a distribuição de células positivas para p27 e Skp2 são inversas e topograficamente diferentes. A expressão de p27 ocorre quase que exclusivamente nos núcleos com diferenciação terminal, ou seja, células epiteliais suprabasais. Já a expressão da proteína Skp2 é bastante marcante nas células epiteliais da camada basal, onde escassas células apresentaram marcação para p27 (Gstaiger *et al.*, 2001).

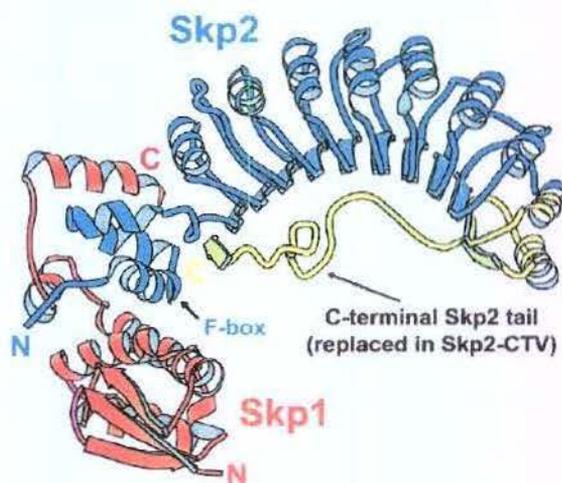
Durante a progressão tumoral, os níveis protéicos de Skp2 estão alterados nas células displásicas e neoplásicas. Nesses casos, há superexpressão da proteína Skp2, o que leva à degradação da proteína p27 pelo sistema ubiquitina-proteossomo e favorece a progressão tumoral. Logo, expressão de Skp2 é inversamente proporcional ao da proteína p27 (Gstaiger *et al.*, 2001; Drobnjak *et al.*, 2003; Kitajima *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007).

Diversos estudos consideram que a superexpressão de Skp2 e a diminuição nos níveis protéicos de p27 são importantes fatores no prognóstico e na sobrevida de pacientes com câncer (Shintani *et al.*, 2003; Kudo *et al.*, 2005; Shapira *et al.*, 2005). Sendo assim, Skp2 é considerado como oncogene intimamente ligado à degradação de p27 e se tornou alvo de pesquisas para sua utilização como marcador de prognóstico e auxílio na terapia anticâncer (Gstaiger *et al.*, 2001; Signoretti *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2005).

Ganiatsas *et al.* (2001) relataram uma variante da proteína Skp2, por eles denominada Skp2-CTV (*C-terminal variant*). Esta nova forma de Skp2 difere na seqüência de 365 aminoácidos acrescido na região C-terminal e interrupções na sexta e sétima regiões ricas em lisinas (Figura 02). A expressão dessa variante deve-se a *splice* alternativo no gene que codifica a proteína Skp2, localizada no cromossomo 5.

Esses mesmos autores relatam que a forma Skp2-CTV permanece no citoplasma, pois acreditam que a porção C-terminal da Skp2-CVT contém domínios que desencadeiam a retenção citoplasmática, sobrepondo-se ao sinal de localização nuclear presente na proteína Skp2. Além disso, a Skp2-CVT falha na sua ligação com a proteína Skp1 e na formação do complexo SCF<sup>Skp2</sup>.

Radke *et al.* (2005) também relataram a presença de Skp2 citoplasmática em células de câncer de mama, denominando-a de Skp2-B. Concluíram que Skp2-B está superexpressa, com a mesma frequência que a proteína Skp2, em linhagens de células de câncer de mama e no tumor primário de mama, sendo os níveis de Skp2-B mais altos quando comparados ao Skp2. Além disso, como a proteína Spk2-B difere no domínio C-terminal e carece das três últimas LRR (regiões ricas em lisina), não promove a ubiquitinação da proteína p27. Portanto, os autores sugerem que a proteína Skp2-B quando superexpressa participa da formação do câncer agindo sobre outras proteínas e não na degradação p27. Além disso, previne a morte celular por apoptose.



**Figura 02:** Diagrama esquemático da estrutura do Skp2, exibindo seqüência diferente de aminoácidos, localizado na porção C-terminal e sua relação com a proteína Skp1. Em vermelho proteína Skp1 e em azul proteína Skp2. Em amarelo representa a porção C-terminal presente na Skp2-variante.

**Fonte:** Ganiatsas et al (2001)

quinase. Sob condições fisiológicas, a ativação dos receptores ErbB é controlada pela expressão dos peptídeos da família do fator de crescimento epidérmico (EGF) (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). O ErbB-2 é uma proteína de 185 kDa, cujo gene está localizado no braço curto do cromossomo 17 e apresenta grande homologia com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Wilkman *et al.*, 1998; Kustner *et al.*, 2004).

A interação entre EGF/receptor promove a homo ou heterodimerização dos receptores ErbB e subsequente auto-fosforilação ou fosforilação cruzada. Isto inicia uma complexa via de sinalização intracelular, a qual termina na fosforilação de fatores de transcrição, gerando amplo espectro de atividades biológicas (O-Charoenrat *et al.*, 2002). Em condições normais o receptor ErbB-2 é ativado após a sua heterodimerização com outros receptores da família ErbB, promovendo ativação forte e prolongada das vias de sinalizações intracelulares (Holbro *et al.*, 2003).

O gene ErbB-2 pode funcionar como oncogene (Kumar-Sinha *et al.*, 2003), uma vez que se observou alta expressão dessa proteína nos cânceres de mama, ovário e próstata (Signoretti *et al.*, 2000; Yarden, 2001; Ross *et al.*, 2003, Kumar-Sinha *et al.*, 2003).

Os receptores da família ErbB, quando ativados, desencadeiam sinais via PI-3K e MAP-quinase, os quais controlam a expressão da FAS (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Por outro lado, pesquisas recentes mostraram que FAS regula a expressão e atividade desse receptor de superfície em linhagens celulares de câncer de mama e de ovário, pois inibindo-se a FAS houve diminuição nos níveis de ErbB-2 (Menendez *et al.*, 2004).

Vários estudos vêm demonstrando aumento na expressão de ErbB-2 em carcinomas espinocelulares de boca (Xia *et al.*, 1997; Wilkman *et al.*, 1998; Werkmeister *et al.*, 2000; Vora *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2004; Agostini *et al.*, 2004; Perea *et al.*, 2005). Field *et al.* (1992) foram um dos primeiros pesquisadores a estudarem a expressão de ErbB-2 em carcinomas de boca. Esses autores analisaram 75 casos de carcinomas espinocelulares e verificaram que 60% dos

## 02.7 Ki-67

A determinação histológica da atividade proliferativa de células e tecidos sob condições normais ou patológicas, indicando zonas e células em proliferação, é um importante fator a ser analisado, pois está associada ao comportamento biológico das neoplasias e ao curso clínico do tumor. Várias técnicas histológicas têm sido empregadas para detectar a atividade proliferativa das células em tecidos neoplásicos, dentre elas: contagem do número de células em mitose, marcação por timidina, marcação pela bromodeoxiuridina (BrdU) e a expressão de antígenos associados à proliferação celular como o Ki-67 (Ito *et al.*, 1998; Birner *et al.*, 2001).

O anticorpo Ki-67 liga-se às proteínas nucleares não histônicas, de peso molecular entre 345 e 395 kDa. Este antígeno é expresso em células na fase de G1, S, G2 e mitose, porém não está expresso na fase G0 do ciclo celular (Gerdes *et al.*, 1991; Gonzáles-Moles *et al.* 1996).

Ito *et al.* (1998) estudaram o anticorpo Ki-67 produzido pelo clone MIB-5, o qual tem a capacidade de imunomarcação para tecidos originados de ratos e camundongos. Nesse estudo comparou-se a marcação obtida através de reação de imunohistoquímica com anticorpo Ki-67 (clone MIB-5), a marcação por BrdU e a contagem de células em mitoses nos adenomas e adenocarcinomas pulmonares induzidos quimicamente pelo 4NQO. Os autores concluíram que a imunomarcação produzida pelo anticorpo Ki-67, clone MIB-5, é útil na quantificação da atividade proliferativa em tecidos normais e tumorais obtidos de ratos e camundongos.

Birner *et al.* (2001) também verificaram que a imunomarcação produzida pelo anticorpo monoclonal Ki-67, clone MIB-5, está positivamente correlacionado a porcentagem de células marcadas pela técnica de BrdU e a frequência de figuras mitóticas nos tecidos normais e neoplásicos obtidos de camundongos da linhagem C57BL/6. Os resultados indicaram que MIB-5 consegue detectar com segurança e reprodutibilidade a fração de células em proliferação em tecidos murinos parafinados e fixados em formol.

Portanto, o Ki-67/MIB são anticorpos monoclonais, cuja marcação aumenta em tecidos que apresentam proliferação celular, sendo que há estreita relação entre o número de células marcadas com o grau histológico dos carcinomas espinocelulares de boca (Tumuluri *et al.*, 2002). Apesar de bastante utilizado como marcador de proliferação celular, a sua função biológica ainda é desconhecida e sua utilização como marcador molecular para o estabelecimento do prognóstico de carcinomas espinocelulares de boca é ainda controverso. Aguiar *et al.* (2007) verificaram que baixas taxas de proliferação estavam relacionadas a carcinoma espinocelular de boca bem diferenciados, porém que tiveram recorrências locais precoce.

Liu *et al.* (1998) avaliaram o comportamento proliferativo da mucosa bucal normal em três diferentes regiões (assoalho de boca, borda lateral de língua e mucosa jugal) e das leucoplasias com diferentes graus de displasia. Os pesquisadores concluíram que a marcação por Ki-67/MIB ficou restrito à camada basal e parabasal nos tecidos normais, não havendo diferenças entre os diversos locais analisados. Já nos tecidos derivados de leucoplasias com displasias de alto grau, houve maior marcação nuclear principalmente na camada basal e na camada superficial.

Vários estudos têm demonstrado aumento no índice de marcação por Ki-67/MIB nas leucoplasias e eritroplasias que apresentam epitélio displásico, sugerindo aumento na atividade proliferativa celular nessas lesões (Zoeller *et al.*, 1994; Kushner *et al.*, 1997; Oliver & MacDonald, 2001; Piattelli *et al.*, 2002; Takeda *et al.* 2006).

Kearsley *et al.* (1990) analisaram a expressão celular para o antígeno Ki-67 em 42 amostras tumorais (cinco CECs bem diferenciadas, 28 CECs moderadamente diferenciadas e nove CECs pobremente diferenciados) e encontraram variação na porcentagem de células que reagiram com o anticorpo monoclonal Ki-67. Baixo índice de proliferação (menos de 10% de células marcadas positivamente) foi obtido em 35,8% dos casos (15 amostras), proliferação intermediária (entre 10 e 30% de células positivas) foi encontrada em

45,2% dos casos analisados (19 amostras) e alto índice proliferativo (superior a 30% de células positivas) estava presente em somente 19,0% dos casos (oito amostras). Tsuji *et al.* (1992) também mensuraram a proliferação celular em carcinomas espinocelulares de boca com diversos marcadores (PCNA, Ki-67, fração da fase S – SPF e contagem AgNORS) e encontraram índice de proliferação que variou de 4,9% a 40% (média de 24,1%) quando se utilizou a marcação pelo anticorpo Ki-67.

Roland *et al.* (1994) estudaram 79 amostras de carcinomas espinocelulares de boca e encontraram índice de proliferação celular de 27,8%, em média, de células positivas para Ki-67. O valor mínimo encontrado foi de 88 células positivas em 1000 células contadas e o valor máximo obtido foi de 808 células marcadas em 1000 células analisadas. No entanto, os autores não encontraram nenhuma relação entre o índice de proliferação celular e as características clínicas do tumor.

González-Moles *et al.* (1996) verificaram ausência de expressão do antígeno Ki-67 em 49% dos 74 casos de carcinomas espinocelulares de boca analisados. Nos tumores positivos, 36,5% tiveram ligeira expressão, 10,8% expressão moderada e 10,8% alta taxa de proliferação celular, sendo as maiores taxas observadas em tumores indiferenciados com intenso pleomorfismo nuclear. No entanto, os autores relataram ausência de correlação entre a sobrevivência dos pacientes e o índice de proliferação celular.

## **02.8 Inibição da FAS e os efeitos celulares**

A FAS por estar expressa em neoplasias malignas, pode ser útil para o desenvolvimento de drogas quimiopreventivas contra os cânceres mais comuns (Lu & Archer, 2005), dentre eles o câncer de boca (Zhang *et al.*, 2005). Recentemente demonstrou-se que a inibição da FAS pode interferir na proliferação celular tumoral, induzindo as células a entrarem em apoptose

(Heiligtag *et al.* 2002; Guo *et al.*, 2003; Knowles *et al.*, 2004; Kridel *et al.*, 2004; Lu & Archer, 2005; Menendez *et al.*, 2005b).

A cerulenina ([2R, 3S] -2,3 epoxi-1-oxo-7, 10 trans, transdodecadienamida), produto natural do fungo *Cephalosporium caerulens*, inibe de forma irreversível a atividade da enzima FAS através da ligação covalente ao sítio ativo  $\beta$ -cetoacil sintase, responsável pela reação de condensação dos substratos acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

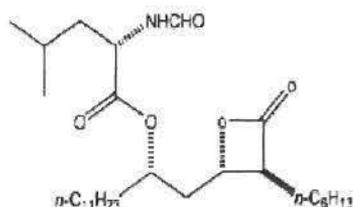
C75, análogo sintético da cerulenina, é formado por uma cadeia com 7 carbonos ( $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -butirolactona) e possui os mesmos efeitos inibitórios sobre a atividade de FAS com a vantagem de ser mais estável e, portanto, ter melhor efeito "in vivo" (Kuhajda *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

Ambos os inibidores da FAS impedem a progressão do ciclo celular, bloqueando a passagem da fase G0/G1 para a fase S em linhagens celulares derivadas de neoplasias malignas humanas (Pizer *et al.*, 1998; Kuhajda, 2000; Li *et al.*, 2001). Menendez *et al.* (2005a) relataram que a inibição da FAS induz completa perda de células nas fases G2 – M e concomitantemente aumento das células no estágio G1.

Pizer *et al.* (1998) observaram que o tratamento com inibidores da FAS, principalmente a cerulenina e C75, causaram redução no tamanho de tumores em modelos xenográficos, cujas células neoplásicas eram derivadas de câncer de ovário e foram injetadas intraperitonealmente em camundongos *nude*. Os mesmos pesquisadores Pizer *et al.* (2000), também relataram marcante redução na síntese de ácidos graxos e no tamanho dos tumores após tratamento com C75 de camundongos que receberam implantes subcutâneos de células derivadas de câncer de mama (MCF7).

O Orlistat (Xenical<sup>®</sup> - Roche), droga aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento antiobesidade, é derivado semi-sintético da lipostatina e atua inibindo irreversivelmente as lipases gástricas e pancreáticas no interior do trato gastrintestinal, diminuindo a absorção de gorduras (Guercioli *et al.*, 1997). Além disso, o Orlistat também demonstrou ter efeito inibitório sobre a

FAS, pois atua no sítio catalítico tioesterase, o qual é responsável pela liberação das moléculas de palmitato recém sintetizadas (Kridel *et al.*, 2004). A inibição de FAS com Orlistat apresentou propriedades antitumorais e antiproliferativas em modelo xenográfico de câncer de próstata e em linhagens celulares derivadas de câncer de próstata e mama (Knowles *et al.*, 2004; Kridel *et al.*, 2004).



**Figura 03:** Estrutura do  $\beta$ -lactone tetrahidrolipostatina (Orlistat).

**Fonte:** Menendez et al (2005a).

Menendez *et al.* (2005b) avaliaram o efeito do Orlistat sobre linhagens celulares derivadas de carcinoma de estômago (NCI-N87) e de mama (SK-Br3). Esses pesquisadores verificaram que o Orlistat, além da inibição da síntese de ácidos graxos, causou bloqueio do ciclo celular na fase G0/G1, evitando a entrada na fase S. Outros achados interessantes foram à inibição da atividade do promotor de ErbB-2, através da estimulação da proteína PEA-3, levando à redução de até 90% na expressão da proteína ErbB-2; e o aumento nos níveis de p27, estimulando a apoptose celular.

Zhang *et al.* (2005) observaram rápido aumento nos níveis de malonil coenzima A com a inibição da FAS, alterando o metabolismo mitocondrial e ativando o processo de apoptose.

Carvalho (2007) estudou o efeito antitumoral do Orlistat em melanomas induzidos por injeção intraperitoneal de células B15F10 (derivadas de melanoma murino) em camundongos C57BL/6. O bloqueio da atividade da enzima FAS com o Orlistat diminuiu significativamente as incidências de metástases espontâneas (redução de 50%) a partir da cavidade peritoneal para os linfonodos mediastinais. Além disso, a inibição da FAS pelo Orlistat promoveu bloqueio do ciclo celular nas células B16F10 e aumentou o número de células em apoptose. Outro achado

importante foi o aumento quantitativo da proteína p27, ao mesmo tempo em que houve redução nos níveis protéicos de Skp2, nas células B16F10 tratadas com Orlistat.

No entanto, apesar de promissores, os estudos que visam a inibição farmacológica de FAS, como alternativa para o tratamento de neoplasias malignas, devem ser interpretados com cautela. Primeiramente o Orlistat administrado via oral possui biodisponibilidade muito baixa, sendo necessário o desenvolvimento de novas formulações para o tratamento antitumoral (Menendez *et al.* 2005b). Segundo, o bloqueio de FAS *in vivo* pode causar efeitos colaterais como anorexia e perda de peso (Clegg *et al.*, 2002), além de apresentar um alto potencial teratogênico (Chirala *et al.*, 2003). E finalmente, a cerulenina é capaz de inibir o crescimento de fibroblastos humanos normais em culturas primárias, sugerindo que a produção endógena de ácidos graxos não seja essencial somente para as células malignas (Almeida *et al.*, 2005).

## 3 PROPOSIÇÃO

### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal desta pesquisa foi comparar a expressão das proteínas FAS, ErbB-2, p27 e Skp2, juntamente com um marcador de proliferação celular (Ki-67), durante o processo de carcinogênese bucal induzida quimicamente em camundongos; bem como, verificar o efeito do Orlistat durante este processo.

### 3.2 Objetivo específico

- Estudar a expressão de FAS, ErbB-2, p27, Skp2 e Ki-67 nos diversos graus de displasias (displasia leve, moderada, severa / carcinoma *in situ*) em tecidos obtidos de camundongos tratados com 4NQO;
- Averiguar a expressão de FAS, ErbB-2, p27, Skp2 e Ki-67 nos carcinomas espinocelulares de boca dos camundongos que foram expostos ao 4NQO;
- Verificar o efeito do Orlistat no processo de carcinogênese bucal por meio da expressão de FAS, ErbB-2, p27, Skp2 e Ki-67, nos camundongos tratados com 4NQO e injeção intraperitoneal de Orlistat.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo faz parte da linha de pesquisa do programa de pós-graduação em Estomatopatologia, denominada Carcinoma Espinocelular.

Este trabalho foi submetido à apreciação e aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (n° 842-1, CEEA-IB-UNICAMP – Anexo 1).

### 4.1 Modelo Animal

O modelo animal utilizado neste estudo foi baseado no trabalho de Tang *et al.* (2004), os quais compararam o efeito indutor de câncer bucal do 4NQO quando administrado em água, com o já consagrado método de pincelagem do agente cancerígeno sob o dorso de língua dos animais.

Para tanto, foram solicitados junto ao CEMIB-UNICAMP, trinta e cinco camundongos da linhagem C57BL/6, machos com 5 semanas de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, alimentados com ração comercial Labina (Purina, Brasil) e providos de água *ad libitum*. Os animais ficaram em sala climatizada, com controle automático de iluminação, alternando períodos claros e escuros a cada 12 horas.

Quando os animais atingiram 6 semanas de vida, a água foi acrescida de propilenoglicol ou 4NQO (Sigma, E.U.A) e fornecida *ad libitum* aos animais durante 16 semanas, conforme Tabela 01. Após a 16ª semana os animais receberam somente água, sem o acréscimo de substâncias químicas.

As gaiolas eram limpas três vezes por semana, enquanto a ração e a água acrescida de propilenoglicol ou 4NQO eram trocadas uma vez na semana, sendo o consumo de água anotado em ficha apropriada.

Os animais foram acompanhados durante 16, 18, 20 e 25 semanas, conforme o grupo ao qual pertenciam. Semanalmente os animais eram pesados e os dados obtidos anotados.

Dos trinta e cinco camundongos solicitados, somente 33 participaram efetivamente do estudo, pois 02 animais foram sacrificados para padronização da técnica de dissecação e remoção dos órgãos e tecidos de interesse para o estudo.

**Tabela 01:** Distribuição dos animais, metodologia utilizada e o tempo em que os animais receberam tratamento antes de serem sacrificados.

<b>GRUPO</b>	<b>Nº de animais</b>	<b>Metodologia aplicada</b>	<b>Tempo</b>
<b>01</b> (Controle)	7	Água acrescida de propilenoglicol Somente água	16 semanas mais 09 semanas
<b>02</b> (Experimental)	5	Água acrescida com 4NQO Somente água Injeção intraperitoneal de Orlistat	16 semanas mais 09 semanas 15 dias
<b>03</b> (Experimental)	5	Água acrescida com 4NQO Somente água	16 semanas mais 09 semanas
<b>04</b> (Experimental)	6	Água acrescida com 4NQO Somente água	16 semanas mais 04 semanas
<b>05</b> (Experimental)	5	Água acrescida com 4NQO Somente água	16 semanas mais 02 semanas
<b>06</b> (Experimental)	5	Água acrescida com 4NQO	16 semanas

#### **4.2 Preparo da solução de 1-óxido 4-Nitroquinolina (4NQO)**

Inicialmente preparou-se a solução estoque de 4NQO, cuja concentração adotada foi de 5 mg/ml (250 mg de 1-óxido 4-nitroquinolina - Sigma, E.U.A., misturado em 50 ml de propilenoglicol - Synth). O frasco contendo a solução de estoque foi envolto em papel alumínio e acondicionado em geladeira a 4°C, para evitar degradação do agente carcinogênico.

Nos dias em que ocorria a troca da água das gaiolas, a solução de estoque era retirada da geladeira e dissolvida em água no volume necessário para a concentração de 100 µg/ml. Esta nova solução era colocada nas mamadeiras das

gaiolas e fornecida *ad libitum* aos animais dos grupos 02, 03, 04, 05 e 06. O processo foi realizado durante 16 semanas para os animais dos grupos acima citados.

Já os animais do grupo 01 receberam água acrescida somente de propilenoglicol no mesmo volume de solução estoque utilizado durante o preparo da água dos grupos acima descritos, durante 16 semanas.

#### 4.3 Preparo da solução de Orlistat e tratamento dos animais

Para a aplicação nos camundongos, o composto ativo Orlistat (Xenical<sup>®</sup>, Roche, Suíça) foi extraído de acordo com Knowles *et al.* (2004), dissolvendo-se o conteúdo de duas cápsulas em 2 ml de etanol a 33% em PBS (660 µl de etanol absoluto e 1340 µl de solução salina tamponada com fosfato - PBS). A solução foi mantida sob agitação durante 30 minutos em temperatura ambiente, em seguida, centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C até o momento do uso. Desse modo, conseguiu-se solução com 240 mg do princípio ativo Orlistat.

Nos últimos 15 dias (23<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> semanas) os animais do grupo 2 foram tratados diariamente com solução de Orlistat, em dosagem de 240 mg/kg, via intraperitoneal. A quantidade de solução aplicada foi determinada individualmente, de acordo com o peso dos animais.

#### 4.4 Obtenção das amostras

Os animais dos grupos 1, 2 e 3 foram sacrificados por deslocamento cervical quando atingiram a 25<sup>a</sup> semana de tratamento. Imediatamente foi realizada a dissecação dos animais, sendo a língua, o palato, esôfago, estômago, fígado, baço e rins removidos e fixados em formol neutro a 10% por 24 a 72 horas. O mesmo procedimento foi repetido para os grupos 4, 5 e 6 na 20<sup>a</sup>, 18<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semanas de tratamento, respectivamente.

Os tecidos foram processados e incluídos em parafina no Laboratório de Histopatologia da Área de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / Unicamp (FOP/Unicamp). Porém somente a língua dos animais foi utilizada neste estudo, os demais tecidos ficaram armazenados em caixas específicas para futuras pesquisas.

Cortes histológicos com 5 µm de espessura da língua e do esôfago foram obtidos e corados com Hematoxilina e Eosina, conforme protocolo adotado no Laboratório de Histopatologia da FOP/Unicamp (Anexo 2).

#### **4.5 Análise histológica**

A análise dos cortes histológicos corados em Hematoxilina e Eosina (HE) foi realizada em microscopia de luz nos laboratórios da área de Patologia da FOP/Unicamp, por meio de microscópio binocular (Nikon YS 100, Japão) adaptado com ocular WSCF 10X/18 e objetivas NIKON 4X/0,10, 10X/0,25, 40X/0,65 e 100X/1,25. Previamente a leitura, as lâminas tiveram as identificações cobertas, para a realização de estudo duplo-cego, evitando desta maneira qualquer indução de resultado durante a leitura.

As lâminas de esôfago somente foram avaliadas para a presença ou não de carcinoma espinocelular invasivo ou *in situ*, sendo os resultados anotados em ficha apropriada.

Já nas lâminas de língua, avaliou-se a presença ou não de carcinoma espinocelular e as alterações epiteliais, que foram classificadas em displasias leves, displasias moderadas, displasias severas / carcinomas *in situ*. Os critérios utilizados para a classificação das displasias estão de acordo com o preconizado pela Organização Mundial da Saúde (Gale *et al.*, 2005), sendo os seguintes:

- Alterações na arquitetura do tecido: estratificação epitelial irregular, perda da polaridade das células da camada basal, aumento no número de figuras

mitóticas, mitoses superficiais anormais, disqueratose (queratinização prematura), pérolas de queratina dentro das projeções epiteliais.

- Alterações citológicas: anormalidades no tamanho nuclear (anisonucleose), pleomorfismo nuclear, variação no tamanho das células (anisocitose), pleomorfismo celular, aumento na relação núcleo/citoplasma, figuras mitóticas atípicas, aumento no número e tamanho dos nucléolos e hiperchromatismo nuclear.

Quando as atipias estavam restritas ao terço inferior do tecido epitelial, considerou-se área com displasia leve. Áreas de displasia moderada foram consideradas quando as atipias ocupavam até a metade inferior do tecido epitelial. Foram classificadas como displasia severa / carcinoma *in situ* áreas nas quais as atipias eram marcantes e ocupavam mais que dois terços da espessura epitelial e eram acompanhadas de alterações na arquitetura do tecido epitelial.

Optou-se nesse estudo, por não diferenciar displasias severas de carcinomas *in situ* devido à grande subjetividade desta distinção. Quando havia dúvidas quanto à presença ou não de invasão tumoral no tecido conjuntivo, os cortes eram aprofundados e novas lâminas confeccionadas.

Nas lâminas que apresentavam carcinomas invasivos, a área tumoral foi determinada. Para tanto, a imagem do tumor na lâmina foi capturada em uma ampliação de 100 vezes, por câmera de vídeo (Sony CCD Íris/RGB, EUA) acoplada ao microscópio de luz (Zeiss, Alemanha) e a área determinada pelo programa Kontron System 400 (Kontron System 400 versão 2.0, Carl Zeiss, Alemanha). Os dados obtidos foram registrados em fichas individuais.

Todas as lâminas foram analisadas pelo autor da pesquisa, que passou por treinamento prévio quanto ao reconhecimento da presença ou ausência das alterações celulares, além de contar com a supervisão de um patologista mais experiente (JJJ).

## 4.6 Imunohistoquímica

Para reações de imunohistoquímica foram realizados cortes com 3 µm de espessura dos blocos de parafina contendo a língua. Os cortes foram fixados em lâminas silanizadas (*3-aminopropyl-triethoxysilane*, Sigma Aldrich, EUA) e colocados em estufa a 56°C por 24 horas. Na seqüência, os cortes foram diafanizados em xilol, com duas trocas de 10 minutos em temperatura ambiente e hidratados em concentrações decrescentes de etanol (absoluto, 90%, 70%, 50%) seguindo-se banho em água. Após a hidratação dos cortes foi então realizada a recuperação antigênica, específica para cada anticorpo utilizado. A relação de anticorpos e os detalhes técnicos utilizados encontram-se sumarizados na Tabela 2.

**Tabela 02:** Relação dos anticorpos utilizados, indicando o clone, marca, a concentração e o método de recuperação antigênica.

Anticorpo	Clone / Nº Catálogo	Marca	Concentração	Recuperação antigênica
Ki-67	MIB-5 / M7248 (monoclonal)	Dako	1:25	Tampão de Citrato de Sódio (pH 6,0) Banho Maria (95°C) – 30 min.
FAS	23 / 610962 (monoclonal)	Transduction Laboratories	1:100	Tampão Tris/EDTA (pH 9,0) Microondas – 24 min.
ErbB-2	- / A0485 (policlonal)	Dako	1:100	Tampão de Ácido Cítrico (pH 6,0) Microondas – 24 min.
P27	SX53G8 / M7203 (monoclonal)	Dako	1:50	Tampão Tris/EDTA (pH 9,0) Microondas – 24 min.
Skp-2	CA92008 / 32-3400 (monoclonal)	Zymed	1:25	Tampão Tris/EDTA (pH 9,0) Banho Maria (95°C)– 30min

Foi realizada recuperação antigênica em microondas (Panasonic, Brasil), por 24 minutos em potência máxima para os anticorpos primários anti-FAS, anti- ErbB2 e anti-p27. A solução de recuperação antigênica usada para os anticorpos anti-FAS e anti-p27 foi o tampão Tris/EDTA com pH 9,0. Já a solução utilizada na recuperação antigênica para ErbB-2 foi o tampão citrato, à base de ácido cítrico, 10 mM e pH 6,0.

A recuperação antigênica em banho-maria a 95° ou 96°C durante 30 minutos foi utilizada para os anticorpos anti-Ki-67 e anti-Skp2, sendo as soluções de recuperação, respectivamente, tampão de citrato de sódio 10 mM com pH 6,0 e tampão Tris/EDTA pH 9,0.

Após a recuperação antigênica, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 20 minutos para resfriamento.

Na seqüência os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e incubados com solução aquosa de peróxido de hidrogênio 20 volumes (Dinâmica, Brasil) em 6 trocas de 5 minutos cada, para bloqueio da peroxidase endógena. Nova lavagem em água corrente foi realizada, durante 5 minutos e, em seguida, os cortes foram lavados por três vezes de 2 minutos cada com solução fosfatada tamponada (PBS). Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários, previamente diluídos em PBS, por no mínimo 16 horas (*overnight*) a 4°C em câmara úmida. As diluições utilizadas para cada anticorpo foram: 1:25 (anti-Ki-67 e anti Skp2), 1:50 (anti-p27) e 1:100 (anti-FAS e anti-ErbB-2).

Após o tempo de incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados com PBS (3 trocas de 1 minuto) e incubados com Complexo Strept ABC/HRP Duet, Mouse/Rabbit (DAKO, Dinamarca). A primeira incubação foi realizada por 30 minutos a 37°C em câmara úmida para o anticorpo secundário biotilado, nas diluições de 1:200 (para anti-Ki-67, anti-FAS e anti-ErbB-2), 1:350 (anti-p27) e 1:500 (anti-Skp2). A segunda incubação foi realizada por mais 30 minutos a 37°C em câmara úmida com o complexo Streptavidina-Biotina ou Streptavidina HRP. Todos os cortes foram, então, corados com solução de 3,3' tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich, EUA), por 5 minutos a

37°C. Para o preparo dessa solução foram usados 100 ml de PBS, 60 mg de DAB, 1 ml de peróxido de hidrogênio (Dinâmica, Brasil) e 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, EUA). Em seguida, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Carazzi, diafanizados em xilol e montados com bálsamo do Canadá.

Como controle negativo das reações, lâminas com cortes foram submetidas a todas as etapas da reação imunohistoquímica, exceto a incubação com o anticorpo primário.

#### **4.7 Análise das Reações Imunohistoquímicas**

A análise das reações imunohistoquímicas foi realizada nos laboratórios da área de patologia da FOP/Unicamp, em microscopia de luz, utilizando-se microscópio binocular (Nikon YS 100, Japão) adaptado com ocular WSCF 10X/18 e objetivas NIKON 4X/0,10, 10X/0,25, 40X/0,65 e 100X/1,25. Todas as lâminas tiveram as identificações cobertas, para a realização de estudo cego, evitando desta maneira qualquer indução de resultado. A leitura foi realizada pelo autor da pesquisa, após prévio treinamento e sempre sob supervisão de um patologista mais experiente (JJJ).

Para os anticorpos que apresentaram marcação nuclear (Ki-67 e p27) foi realizada contagem de células imunomarcadas. Para tanto, foram selecionados dois campos aleatórios dentro da área estudada, capturou-se a imagem em ampliação de 400 vezes por meio de câmera de vídeo (Sony CCD Íris/RGB, EUA) acoplada ao microscópio (Zeiss, Alemanha). A contagem das células positivas e negativas foi realizada com o auxílio do sistema Kontron 400 (Kontron System 400 versão 2.0, Carl Zeiss, Alemanha). A média aritmética das células positivas e negativas foi determinada e os dados anotados em fichas apropriadas.

Os anticorpos que tiveram marcação citoplasmática (FAS, ErbB-2 e Skp2-B) a análise foi feita de modo semiquantitativo, em ampliação de 100X, utilizando-se a seguinte escala:

- (0) quando não houve imunomarcação;
- (1) quando a quantidade de células que reagiram foi menor ou igual a 10%;
- (2) quando a quantidade de células marcadas variou entre 11% e 50% e
- (3) quando o número de células positivas era maior que 50%.

A intensidade de coloração também foi avaliada, de acordo com a seguinte escala:

- (1) para marcação de baixa intensidade;
- (2) quando a intensidade de coloração era moderada e
- (3) para marcações intensas.

A região analisada para todas as reações imunohistoquímicas era sempre a mesma, sendo previamente determinada nas lâminas coradas com HE e correspondendo as áreas que apresentavam alterações no epitélio (displasia leve, displasia moderada, displasia severa / carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo).

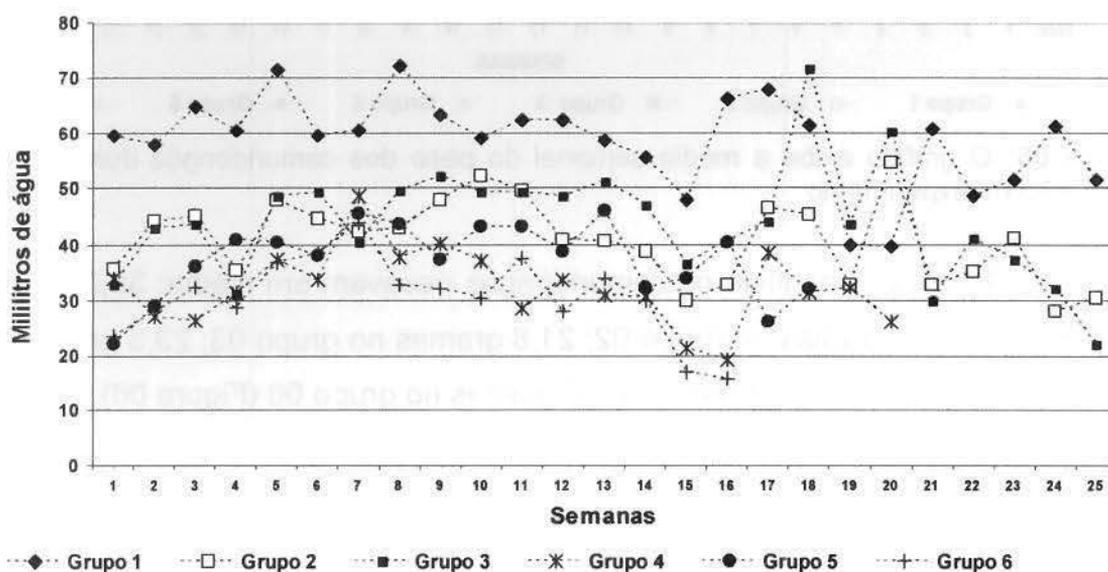
#### **4.8 Análise Estatística**

Os dados coletados foram tabulados no programa *Microsoft Excel* (*Microsoft Office XP<sup>®</sup> Shortcut Bar 2002*). Os testes estatísticos foram realizados através do programa *Bioestat 4,0* (Brasil, 2005). A significância estatística foi verificada através de teste de análise de variância não paramétricos (Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Mann-Whitney). Adotou-se o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 MODELO ANIMAL:

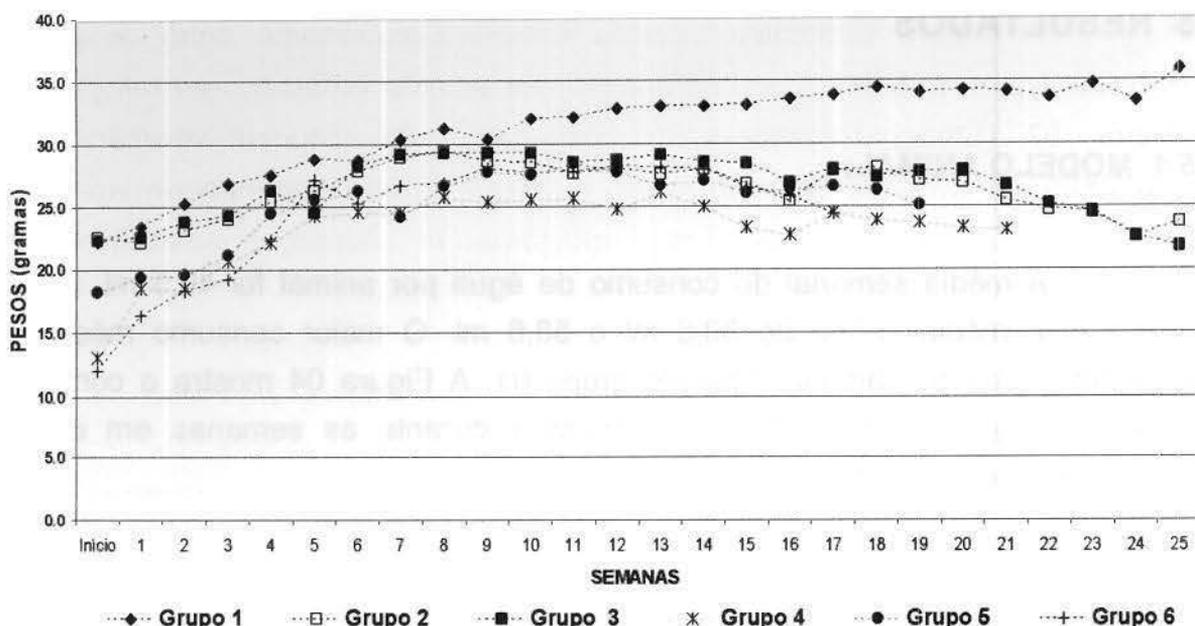
A média semanal do consumo de água por animal foi 40,5 ml, sendo que a taxa média variou de 30,6 ml a 58,6 ml. O maior consumo médio foi verificado entre os camundongos do grupo 01. A Figura 04 mostra o consumo médio de água em cada grupo de animais durante as semanas em que o experimento foi realizado.



**Figura 04:** O gráfico exibe a média semanal de consumo de água dos camundongos, acrescida ou não de 4NQO, durante a realização do experimento.

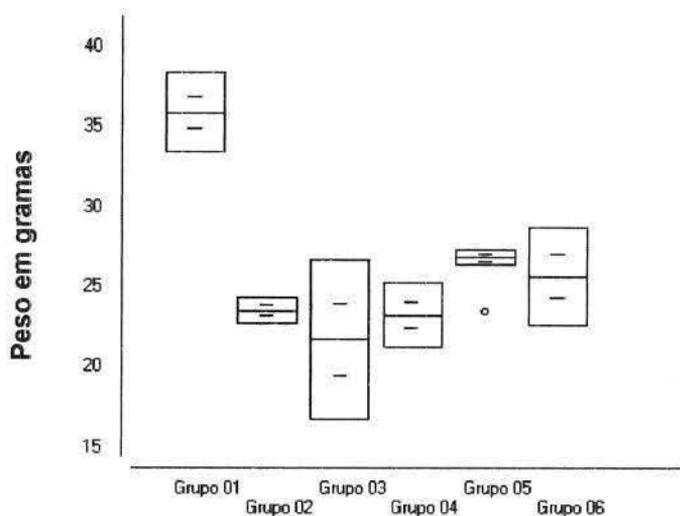
A média geral do peso dos camundongos foi de: 31,3 gramas para o Grupo 01; 26,2 gramas para o Grupo 02; 26,5 gramas para o Grupo 03; 23,1 gramas para o Grupo 04; 25,0 gramas para o Grupo 05 e 24,3 gramas para o Grupo 06.

Até 9ª semana os camundongos apresentavam médias de pesos similares, com pouca variação entre os grupos. No entanto, a partir da décima semana de experimento os camundongos pertencentes ao grupo 01 exibiram um ganho de peso maior que os animais dos outros grupos, como demonstrado na Figura 05.



**Figura 05:** O gráfico exibe a média semanal do peso dos camundongos durante a realização do experimento.

No dia do sacrifício os camundongos pesavam em média: 35,9 gramas no grupo 01; 23,6 gramas no grupo 02; 21,8 gramas no grupo 03; 23,3 gramas no grupo 04; 26,2 gramas no grupo 05; 25,7 gramas no grupo 06 (Figura 06).



**Figura 06:** Média aritmética, amplitude da amostra e desvio padrão do peso dos camundongos no dia em que foram sacrificados.

A análise estatística mostrou diferença significativa entre os grupos (Kruskal Wallis,  $p=0,0010$ ), sendo a diferença entre o grupo 01 em relação aos grupos 02 (Student-Newman-Keuls,  $p=0,0015$ ), 03 (Student-Newman-Keuls,  $p=0,0002$ ), 04 (Student-Newman-Keuls,  $p=0,0003$ ) e 06 (Student-Newman-Keuls,  $p=0,0163$ ). Os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes com relação ao peso no momento do sacrifício.

Os camundongos que desenvolveram carcinoma espinocelular apresentaram diminuição de peso bastante acentuada, chegando alguns animais a pesar 15,65 gramas no dia do sacrifício, como observado na figura 07.

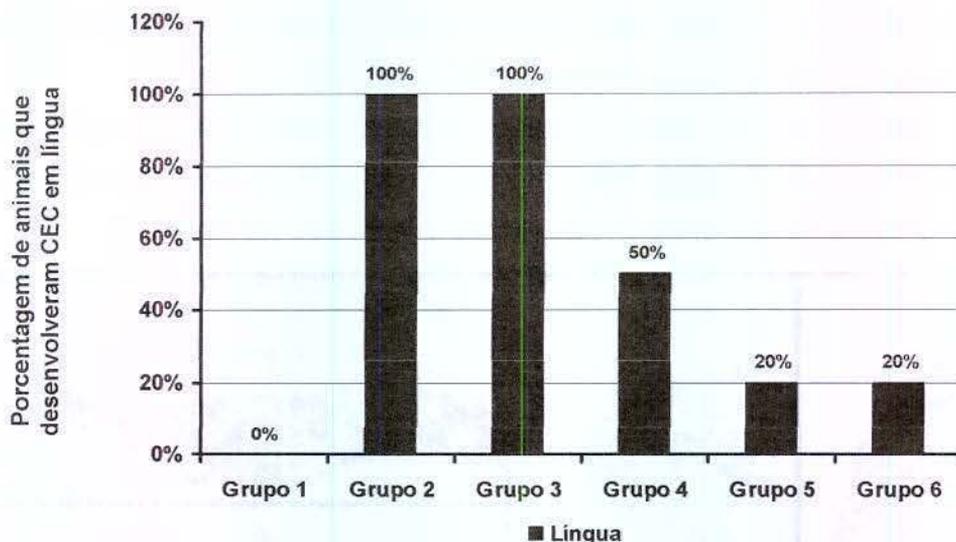


**Figura 07:** O camundongo da imagem A, foi acompanhado por 25 semanas e recebeu nas 16 primeiras semanas somente água misturada com propilenoglicol. A imagem C corresponde ao mesmo animal durante o processo de dissecação. Já o camundongo da imagem B foi tratado por 16 semanas com 4NQO e acompanhado por mais 9 semanas, totalizando 25 semanas. No momento da dissecação (imagem D) observa-se acentuada perda na massa corporal.

Não houve diferença significativa (Student-Newman-Keuls,  $p=0,6471$ ) de peso entre os camundongos que foram tratados com injeção intraperitoneal de Orlistat (grupo 02) e os camundongos que não receberam este tratamento (grupo 03).

Os camundongos do grupo 01 (controle) não apresentaram nenhuma lesão histologicamente evidenciável na língua, como já era esperado. Dos 26 camundongos tratados com 4NQO, 15 (57,7%) desenvolveram carcinoma espinocelular em língua. Todos os camundongos dos grupos 2 e 3 apresentaram

carcinomas invasivos na língua (Figura 08). Isso não foi observado nos grupos 4, 5 e 6 (Figura 08), sendo a prevalência de tumores na língua diretamente proporcional ao tempo de vida dos camundongos. Os grupos 5 e 6 tiveram somente um camundongo (20%) com carcinoma em língua.

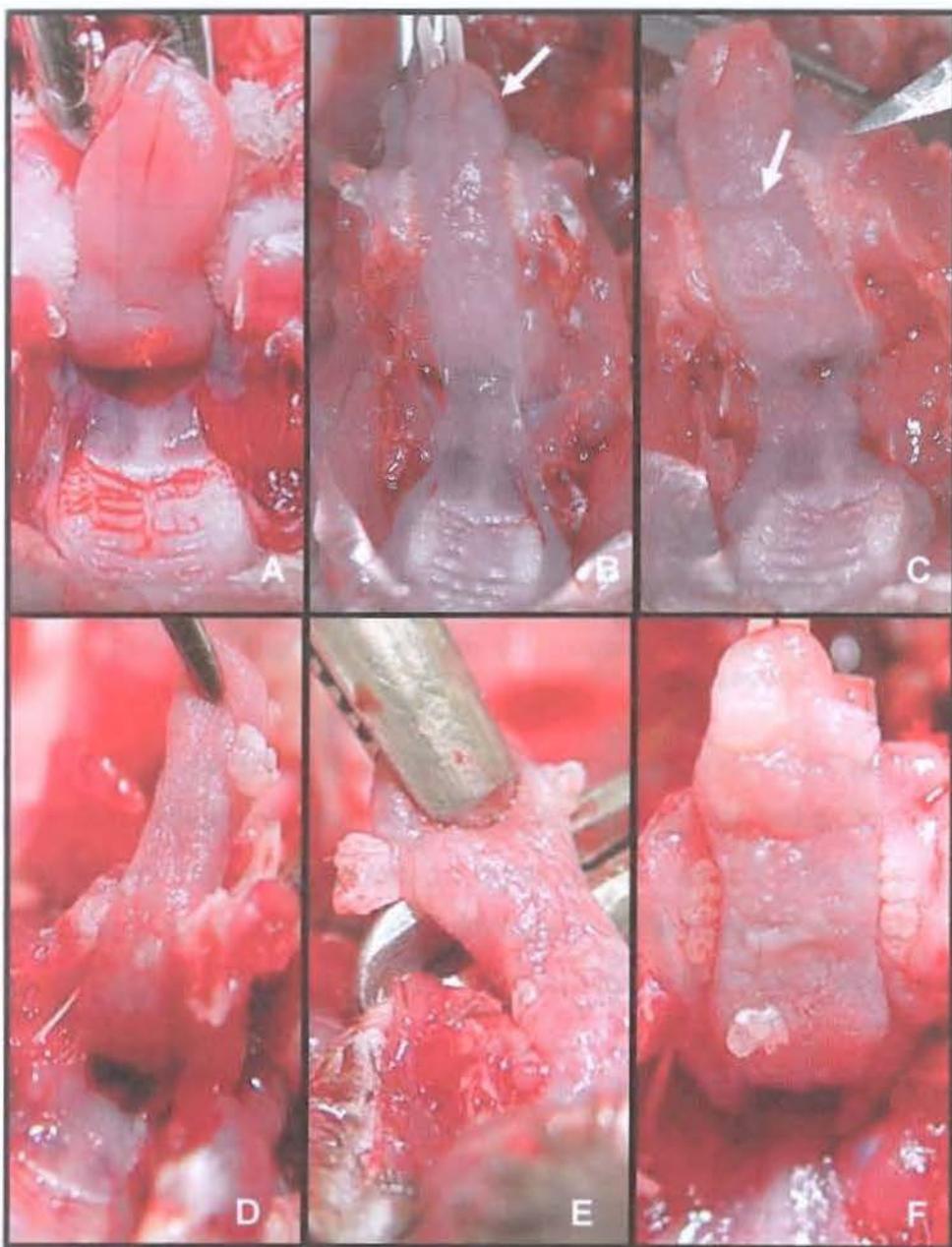


**Figura 08:** Prevalência de carcinomas espinocelulares invasivos em língua de camundongos expostos ao 4NQO durante 16 semanas.

Ao todo foram identificados 24 carcinomas espinocelulares invasivos em língua de camundongos (Tabela 03). Na maioria das vezes havia mais de uma lesão, sendo estas independentes, tanto clinicamente como histologicamente (Figuras 09 e 10).

**TABELA 03:** Número de tumores identificados nos animais de cada grupo experimental.

Grupo (n° de animais)	Carcinomas espinocelulares em língua
Grupo 1 (7)	Nenhuma alteração identificada
Grupo 2 (5)	8 carcinomas invasivos
Grupo 3 (5)	10 carcinomas invasivos
Grupo 4 (6)	4 carcinomas invasivos
Grupo 5 (5)	1 carcinoma invasivo
Grupo 6 (5)	1 carcinoma invasivo

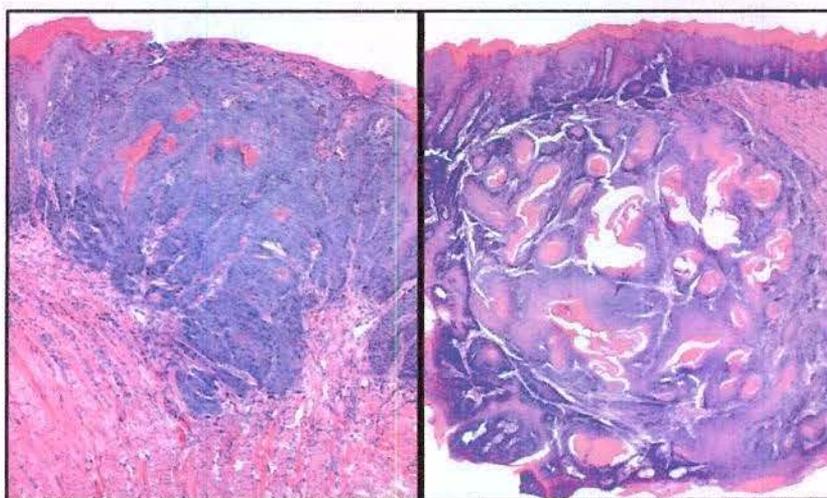


**Figura 09:** Em (A) língua com aspecto de normalidade (camundongo do grupo 01). Em (B) e (C) observa-se irregularidades na superfície dorsal da lingual, bem como áreas esbranquiçadas. As imagens (D), (E) e (F) exibem diferentes lesões exofíticas, em alguns casos, mais de uma lesão estava presente na língua.



**Figura 10:** Em (A) língua normal exibindo as papilas filiformes. A imagem (B) mostra uma língua com três lesões distintas histologicamente.

Dos 24 carcinomas invasivos presentes na língua 41,67% (dez lesões) estavam localizadas no dorso da língua, 37,5% (nove lesões) estavam localizados no ápice e 20,83% (cinco lesões) encontravam-se no ventre lingual. Os tumores variaram desde minimamente invasivos até tumores com grandes áreas de invasão e destruição tecidual, como mostrado na figura 11.



**Figura 11:** Diferenças no grau de invasão dos carcinomas espinocelulares presentes na língua de camundongos expostos ao 4NQO (HE, 25X).

A sobrevivência dos camundongos foi de 97,3%. Somente 01 camundongo morreu no transcorrer do experimento, o qual pertencia ao grupo 02. Foi realizada autópsia deste camundongo, sendo a língua removida e analisada.

## 5.2 ANÁLISE DOS MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS:

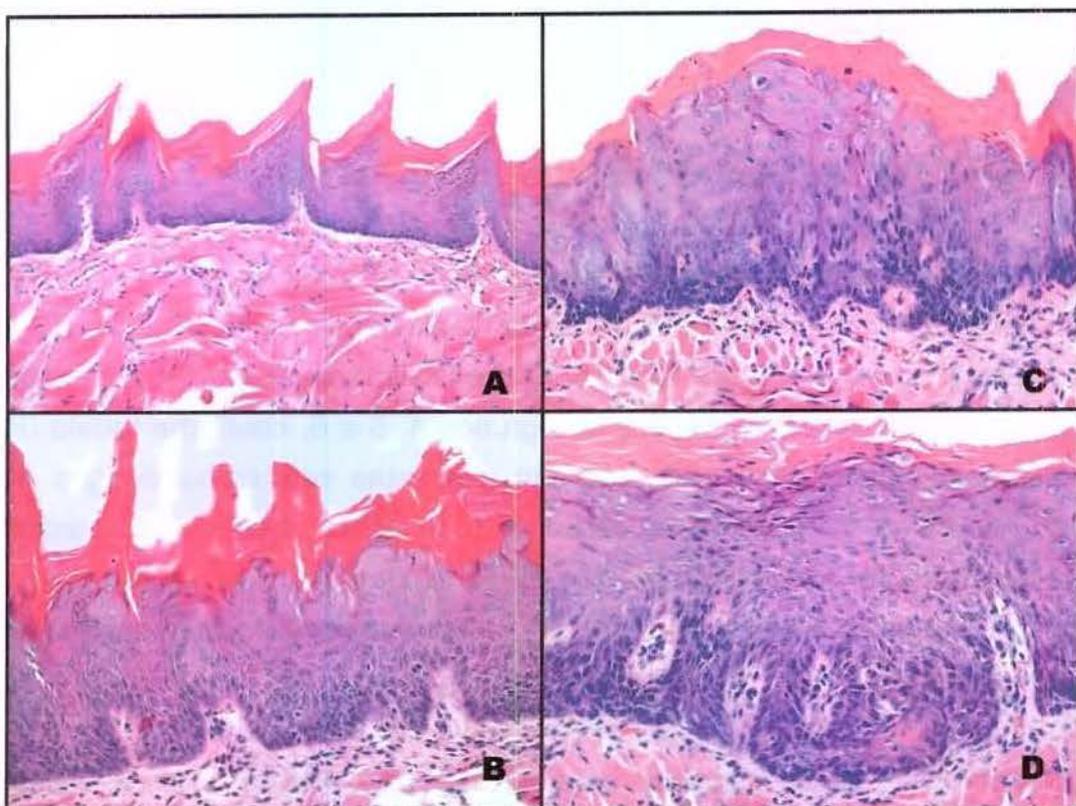
Para a análise dos marcadores imunohistoquímicos no processo de carcinogênese foram utilizados 16 áreas de displasia leve (Figura 12-B), 12 áreas de displasia moderada (Figura 12-C) e 10 áreas de displasia severa/carcinoma *in situ* (Figura 12-D), entre os animais dos grupos 4, 5 e 6, conforme tabela 04. Os carcinomas espinocelulares que estavam presentes nos camundongos destes grupos foram desconsiderados neste estudo. Dez lesões de carcinomas espinocelulares de camundongos do grupo 3, também foram utilizadas para análise imunohistoquímica. Como controle foi utilizado epitélio normal dos animais do grupo 1 (Figura 12-A).

**TABELA 04:** Número de displasias e de carcinomas identificados para análise, em cada grupo experimental.

Grupo	Displasia leve	Displasia moderada	Displasia severa / carcinoma <i>in situ</i>	Carcinoma espinocelular
Grupo 3	-	-	-	10
Grupo 4	2	3	5	-
Grupo 5	6	5	4	-
Grupo 6	8	4	1	-
<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

O número de amostras positivas para os diferentes marcadores imunohistoquímicos está sumarizado na tabela 05. Nota-se diferenças entre o epitélio normal, com displasia leve, moderada, severa/carcinoma *in situ* e

carcinoma espinocelular com relação à expressão das proteínas Ki-67, ErbB-2, FAS, p27 e Skp2-B.



**Figura 12:** Aspecto histológico do epitélio localizado no dorso da língua de camundongos que foram ou não expostos ao 4NQO. Em (A) epitélio exibindo características de normalidade (grupo controle). Em (B) o epitélio exibe displasia leve, estando as alterações restritas a camada basal. A imagem (C) representa uma displasia moderada, associada à hiperplasia epitelial e em (D) o epitélio exibe displasia severa/carcinoma *in situ*, pois mais da metade da espessura do epitélio mostra-se alterada. (HE, 200X).

**TABELA 05:** Percentagem de casos positivos para cada marcador utilizado na pesquisa.

Epitélio	KI-67	ErbB-2	FAS	p27	Skp2-B
Normal	71,4%	14,3%	0,0%	100%	57,1%
Displasia leve	100%	87,5%	25,0%	100%	93,8%
Displasia moderada	100%	91,7%	33,3%	100%	100%
Displasia severa / carcinoma <i>in situ</i>	100%	90%	70,0%	100%	100%
Carcinoma invasivo	90%	100%	60%	100%	100%

A proteína ErbB-2 teve sua expressão aumentada durante o processo de carcinogênese. O padrão de marcação da proteína Skp2-B foi bastante semelhante ao apresentado pela proteína ErbB-2, estando aumentado desde as alterações iniciais no epitélio. A enzima FAS também sofreu elevação em sua expressão durante as etapas da carcinogênese, sendo que 60% dos tumores apresentavam-se positivos para esta enzima. A expressão da proteína p27 foi constatada em epitélio normal, nas áreas displásicas e no carcinoma espinocelular invasivo. No entanto, variação quantitativa foi observada no padrão de imunomarcação desta proteína.

### 5.2.1 Ki-67

O anticorpo anti-Ki-67 apresentou marcação exclusivamente nuclear (Figura 13). Na análise quantitativa observou-se aumento na proliferação celular nas áreas com displasias, como demonstrado na tabela 06.

**TABELA 06:** Quantidade média de células positivas e negativas, por campo analisado, para o anticorpo Ki-67 no epitélio normal, displásico e no carcinoma.

	Epitélio Normal	Displasia Leve	Displasia Moderada	Displasia severa Carcinoma in situ	Carcinoma
Média de células positivas	4,31	53,81	51,25	63,7	58,6
Média total de células contadas	221,7	191,6	223,9	237,6	259,8
% de células positivas	4,31%	26,57%	22,85%	26,12%	23,28%

O epitélio normal apresentou taxa de proliferação de 4,31%, enquanto as áreas displásicas exibiram taxas de 26,57% para as displasias leves, 22,85% para as displasias moderadas e 26,12% para as displasias severas/carcinomas *in situ* (Teste Kruskal-Wallis,  $p=0,0096$ ), diferença estatisticamente significativa. Nas

áreas tumorais o índice de imunomarcção positiva para Ki-67 foi de 23,28%, o que diferiu de modo significativo em relação a imunomarcção ocorrida no epitélio normal (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0168$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa na análise quantitativa entre os diversos graus de displasias e o carcinoma invasivo (Anexo 03).

Nas áreas de carcinoma o padrão de marcação anti-Ki-67 foi bastante variável, pois três casos tiveram baixa quantidade de células positivas (menos de 10%), e um caso não apresentou imunomarcção anti-Ki-67, enquanto duas amostras exibiram positividade celular superior a 45%.

Intensidade de marcação fraca, para o anticorpo anti-Ki-67, foi predominante em amostras de epitélio normal (4 casos, representando 80% dos casos positivos) e carcinoma espinocelular (6 casos, representando 66,7% dos casos positivos). Já nas áreas de displasia a variação na intensidade de imunomarcção foi bem evidente, como demonstrado na tabela 07. Nas áreas de displasia leve predominou a intensidade de imunomarcção moderada (10 casos, representando 62,5% dos casos positivos). As áreas de displasias moderadas apresentaram distribuição equivalente entre marcação fraca, média e intensa, enquanto que as áreas com displasia severa/carcinoma *in situ* foi mais freqüente a intensidade de marcação entre fraca e moderada.

**TABELA 07:** Intensidade de imunomarcção nos casos que apresentaram positividade para o anticorpo anti-Ki-67 (número de casos) no epitélio normal, displásico e no carcinoma.

	Epitélio Normal	Displasia Leve	Displasia Moderada	Displasia severa Carcinoma <i>in situ</i>	Carcinoma
1*	80,0% (4)	12,5% (2)	33,3% (4)	40,0% (4)	66,7% (6)
2*	20,0% (1)	62,5% (10)	33,3% (4)	40,0% (4)	33,3% (3)
3*	0,0% (0)	25,0% (4)	33,4% (4)	20,0% (2)	0,0% (0)
<b>Total</b>	<b>100% (5)</b>	<b>100% (16)</b>	<b>100% (12)</b>	<b>100% (10)</b>	<b>100% (09)</b>

NOTA: \* Escores atribuídos: (1) quando a intensidade de marcação era fraca, (2) marcação de intensidade moderada e (3) marcação intensa.

Houve diferença estatisticamente significativa, na intensidade de imunomarcção para Ki-67, entre epitélio normal e áreas com displasia leve (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0026$ ), displasia moderada (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0180$ ) e displasia severa/carcinoma *in situ* (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0404$ ), as quais exibiram intensidade de marcação variando entre moderada à intensa. No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre o epitélio normal e a área tumoral (Teste Mann-Whitney,  $p=0,3539$ ), pois em ambos tecidos predominou a imunomarcção de intensidade leve para Ki-67.

Ao comparar a intensidade de marcação das áreas com displasia leve e moderada em relação à área tumoral, encontrou-se diferença estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0052$  e  $p=0,0479$ , respectivamente), uma vez que as áreas displásicas exibiram intensidade maior de imunomarcção para Ki-67 do que áreas de carcinoma espinocelular.

### **5.2.2 ErbB-2**

A proteína ErbB-2 apresentou marcação tanto citoplasmática como em membrana celular (Figura 14). Nas margens do tumor predominou a imunomarcção em membrana celular, ao passo que a marcação citoplasmática foi mais evidente nas áreas centrais do processo neoplásico.

A análise semiquantitativa revelou aumento na expressão de ErbB-2 durante o processo de carcinogênese, como demonstrado na tabela 08.

**TABELA 08:** Distribuição dos casos de acordo com o número de células positivas para ErbB-2 (número de casos) no epitélio normal, displásico e no carcinoma.

	<b>Epitélio Normal</b>	<b>Displasia Leve</b>	<b>Displasia Moderada</b>	<b>Displasia severa Carcinoma in situ</b>	<b>Carcinoma</b>
<b>0*</b>	85,7% (6)	12,5% (2)	8,3% (1)	10,0% (1)	0,0% (0)
<b>1*</b>	14,3% (1)	12,5% (2)	8,3% (1)	0,0% (0)	0,0% (0)
<b>2*</b>	0,0% (0)	25,0% (4)	16,7% (2)	40,0% (4)	40,0% (4)
<b>3*</b>	0,0% (0)	50,0% (8)	66,7% (8)	50,0% (5)	60,0 % (6)
<b>Total</b>	<b>100% (7)</b>	<b>100% (16)</b>	<b>100% (12)</b>	<b>100% (10)</b>	<b>100% (10)</b>

NOTA: \* Escores atribuídos: (0) quando não houve marcação, (1) quando menos de 10% das células foram positivas, (2) quando o número de células positivas variou entre 10% e 50% e (3) quando mais de 50% das células apresentaram-se positivas.

Somente um caso de epitélio normal teve imunomarcacão, porém inferior a 10% de células positivas. Por outro lado, áreas displásicas e tumorais exibiram índice de imunomarcacão superior a 10%, na maioria dos casos, representando diferença estatisticamente significativa (Teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,0014$ ) quando comparado ao epitélio normal (Anexo 03). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diversos graus de displasias e o carcinoma invasivo (Teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,7438$  - Anexo 03). Logo, o aumento na expressão do receptor ErbB-2 foi evidenciado nas fases iniciais da carcinogênese e manteve-se elevado durante todo o processo de formação neoplásica e no carcinoma espinocelular.

A imunomarcacão de intensidade fraca foi predominante nas áreas com displasia leve, ao contrário das áreas com displasia moderada, severa e carcinoma invasivo, onde predominou a imunomarcacão de intensidade moderada (Tabela 09). No entanto, não se evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,4633$  – Anexo 03).

**TABELA 09:** Intensidade de imunomarcção nos casos que apresentaram positividade para o anticorpo anti-ErbB-2 (número de casos) no epitélio normal, displásico e no carcinoma espinocelular.

	<b>Epitélio Normal</b>	<b>Displasia Leve</b>	<b>Displasia Moderada</b>	<b>Displasia severa Carcinoma in situ</b>	<b>Carcinoma</b>
<b>1*</b>	100,0% (1)	57,1% (8)	27,3% (3)	33,3% (3)	30,0% (3)
<b>2*</b>	0,0% (0)	35,7% (5)	72,7% (8)	44,5% (4)	60,0% (6)
<b>3*</b>	0,0% (0)	7,2% (1)	0,0% (0)	22,2% (2)	10,0 % (1)
<b>Total</b>	<b>100% (1)</b>	<b>100% (14)</b>	<b>100% (11)</b>	<b>100% (9)</b>	<b>100% (10)</b>

NOTA: \* Escores atribuídos: (1) quando a intensidade de marcação foi fraca, (2) marcação de intensidade moderada e (3) marcação intensa.

### 5.2.3 FAS

A enzima FAS apresentou marcação exclusivamente citoplasmática nas amostras analisadas (Figura 15). Pela análise semiquantitativa verificou-se aumento progressivo no número de células positivas para FAS durante as várias etapas do processo de carcinogênese, como demonstrado na tabela 10.

**TABELA 10:** Distribuição dos casos de acordo com o número de células positivas para FAS (número de casos) no epitélio normal, displásico e no carcinoma.

	<b>Epitélio Normal</b>	<b>Displasia Leve</b>	<b>Displasia Moderada</b>	<b>Displasia severa Carcinoma in situ</b>	<b>Carcinoma</b>
<b>0*</b>	100,0% (7)	75,0% (12)	66,7% (8)	30,0% (3)	40,0% (4)
<b>1*</b>	0,0% (0)	12,6% (2)	8,3% (1)	50,0% (5)	30,0% (3)
<b>2*</b>	0,0% (0)	6,2% (1)	25,0% (3)	10,0% (1)	10,0% (1)
<b>3*</b>	0,0% (0)	6,2% (1)	0,0% (0)	10,0% (1)	20,0 % (2)
<b>Total</b>	<b>100% (7)</b>	<b>100% (16)</b>	<b>100% (12)</b>	<b>100% (10)</b>	<b>100% (10)</b>

NOTA: \* Escores atribuídos: (0) quando não houve marcação, (1) quando menos de 10% das células foram positivas, (2) quando o número de células positivas variou entre 10% e 50% e (3) quando mais de 50% das células apresentaram-se positivas.

O epitélio normal apresentou 100% de suas amostras negativas para a enzima FAS, no entanto, 70% das amostras de displasia severa/carcinoma *in situ* e 60% dos tumores exibiram positividade para FAS, isso representou diferença estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney  $p=0,0168$  e  $p=0,0404$ , respectivamente). No entanto, não se evidenciou diferença estatisticamente significativa ao comparar o epitélio normal com as áreas de displasia leve e moderada, visto que o número de casos positivos nestas amostras não foi expressivo (25% e 33,3%, respectivamente). Também não se observou diferença estatisticamente significativa ao comparar os diversos graus de displasias com a área tumoral (Teste de Kruskal-Wallis  $p=0,2443$  - Anexo 03).

A imunomarcção de intensidade fraca, para a enzima FAS, foi predominante nas amostras de displasia leve (75% dos casos), displasia moderada (75% dos casos), displasia severa/carcinoma *in situ* (85,7% dos casos) e no carcinoma espinocelular (100% dos casos), conforme demonstrado na tabela 11. Nenhuma das amostras analisadas exibiu imunomarcção intensa para FAS, logo não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras analisadas, com relação à intensidade de imunomarcção (Teste de Kruskal-Wallis  $p=0,3684$  - Anexo 03).

**TABELA 11:** Intensidade de imunomarcção nos casos que apresentaram positividade para o anticorpo anti-FAS (número de casos) no epitélio normal, displásico e no carcinoma.

	<b>Epitélio Normal</b>	<b>Displasia Leve</b>	<b>Displasia Moderada</b>	<b>Displasia severa Carcinoma in situ</b>	<b>Carcinoma</b>
<b>1*</b>	0,0% (0)	75,0% (3)	75,0% (3)	85,7% (6)	100,0% (6)
<b>2*</b>	0,0% (0)	25,0% (1)	25,0% (1)	14,4% (1)	0,0% (0)
<b>3*</b>	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)
<b>Total</b>	<b>0% (0)</b>	<b>100% (4)</b>	<b>100% (4)</b>	<b>100% (7)</b>	<b>100% (6)</b>

NOTA: \* Escores atribuídos: (1) quando a intensidade de marcação foi fraca, (2) marcação de intensidade moderada e (3) marcação intensa.

#### 5.2.4 p27

Imunomarcação nuclear foi obtida quando se usou o anticorpo anti-p27, nas amostras estudadas (Figura 16). Tanto o epitélio normal, como os epitélios displásico e neoplásico exibiram imunomarcação para a proteína p27, porém houve variação quantitativa entre as amostras, conforme demonstrado na tabela 12. Nas amostras de epitélio normal predominou índice baixo de imunomarcação (11,33%) para p27, por outro lado, áreas de displasia severa/carcinoma *in situ* e tumoral apresentaram alta percentagem de células positivas (mais de 50%), o que gerou diferença estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0006$  – Anexo 03).

As amostras de displasia epitelial leve também diferiram de modo estatisticamente significativa quando comparadas às amostras de displasia severa/carcinoma *in situ* (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0001$ ) e carcinoma espinocelular (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0001$ ), isto porque, nas áreas de displasia leve o índice de positividade celular foi de 28,82%. Também, pode-se constatar diferença estatisticamente significativa entre o epitélio com displasia moderada e as áreas de displasia severa/carcinoma *in situ* (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0056$ ) e tumorais (Teste Mann-Whitney,  $p = 0,0046$ ). Portanto o epitélio com displasia severa e as áreas de carcinoma espinocelular apresentam maior quantidade de células positivas à proteína p27, do que o epitélio com displasia leve e moderada.

**TABELA 12:** Quantidade média de células positivas, por campo analisado, para o anticorpo anti-p27 no epitélio normal, displásico e no carcinoma.

	Epitélio Normal	Displasia Leve	Displasia Moderada	Displasia severa Carcinoma <i>in situ</i>	Carcinoma
Média de células positivas	28,71	45,56	66,67	125,3	126,3
Média total de células contadas	253,7	167,0	199,9	224,4	245,3
% de células positivas	11,33%	28,82%	36,09%	57,5%	53,55%

A imunomarcção de intensidade fraca para proteína p27 predominou no epitélio normal, conforme demonstrado na tabela 13. Já as áreas displásicas e tumorais revelaram marcação, predominantemente, de intensidade moderada, porém isto não representou diferença estatisticamente significativa (Teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,1362$  - Anexo 03).

**TABELA 13:** Intensidade de imunomarcção nos casos que apresentaram positividade para o anticorpo anti-p27 (número de casos positivos) no epitélio normal, displásico e no carcinoma.

	<b>Epitélio Normal</b>	<b>Displasia Leve</b>	<b>Displasia Moderada</b>	<b>Displasia severa Carcinoma in situ</b>	<b>Carcinoma</b>
<b>1*</b>	57,1% (4)	37,5% (6)	33,3% (4)	20,0% (2)	10,0% (1)
<b>2*</b>	42,9% (3)	62,5% (10)	58,3% (7)	70,0% (7)	70,0% (7)
<b>3*</b>	0,0% (0)	0,0% (0)	8,4% (1)	10,0% (1)	20,0 % (2)
<b>Total</b>	<b>100% (7)</b>	<b>100% (16)</b>	<b>100% (12)</b>	<b>100% (10)</b>	<b>100% (10)</b>

NOTA: \* Escores atribuídos: (1) quando a intensidade de marcação foi fraca, (2) marcação de intensidade moderada e (3) marcação intensa.

### 5.2.5 Skp-2

A proteína Skp-2 apresentou marcação exclusivamente citoplasmática (Figura 17). A literatura já relata esta forma variante da Skp-2 nuclear e denominada de Spk2-B ou Skp2-CVT.

O epitélio normal apresentou baixo índice de imunomarcção para Skp2-B (Tabela 14), ao passo que os tecidos que exibiam displasia leve, moderada, severa e carcinoma espinocelular mais de 50% de suas células tiveram imunomarcção, predominantemente (Kruskal-Wallis,  $p < 0,0001$ ). Logo, alterações quantitativas de Skp2-B podem ser evidenciadas já nas fases iniciais do processo de carcinogênese.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada ao comparar áreas displásicas com áreas tumorais (Kruskal-Wallis,  $p=0,5154$ ), isto indicou que os níveis de Skp2-B permaneceram altos em todo o processo de carcinogênese e no próprio carcinoma espinocelular.

De modo geral, observou-se uma diminuição na intensidade de imunomarcacão com a progressão da carcinogênese bucal, como visto na tabela 15. Contudo, somente a marcação de intensidade moderada à intensa para proteína Skp2-B constatada no epitélio normal, diferiu de modo estatisticamente significativa da marcação moderada à fraca apresentada pelas amostras de displasia epitelial leve (Teste Mann-Whitney,  $p = 0,0455$ ) e displasia severa/carcinoma *in situ* (Teste Mann-Whitney,  $p = 0,0339$ ).

**TABELA 14:** Distribuição dos casos de acordo com o número de células positivas para Skp2-B (número de casos analisados) no epitélio normal, displásico e no carcinoma.

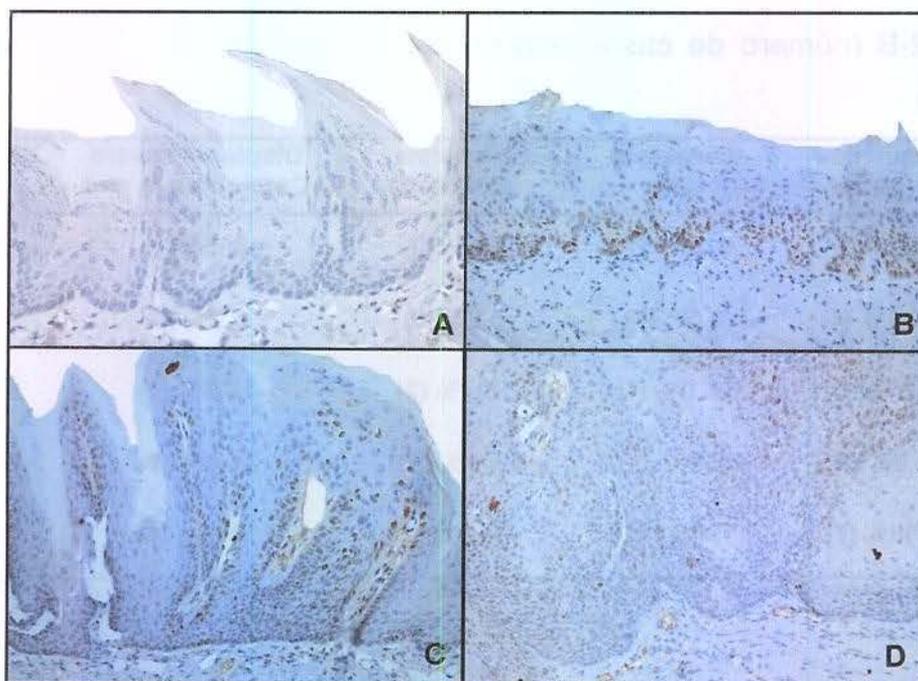
	<b>Epitélio Normal</b>	<b>Displasia Leve</b>	<b>Displasia Moderada</b>	<b>Displasia severa Carcinoma in situ</b>	<b>Carcinoma</b>
0*	42,9 (3)	6,24% (1)	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)
1*	57,1% (4)	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)	10,0% (1)
2*	0,0 % (0)	25,0% (4)	16,7% (2)	10,0% (1)	20,0% (2)
3*	0,0% (0)	68,8% (11)	83,3% (10)	90,0% (9)	70,0 % (7)
<b>Total</b>	<b>100% (7)</b>	<b>100% (16)</b>	<b>100% (12)</b>	<b>100% (10)</b>	<b>100% (10)</b>

NOTA: \* (0) quando não houve marcação, (1) quando menos de 10% das células foram positivas, (2) quando o número de células positivas variou entre 10% e 50% e (3) quando mais de 50% das células apresentaram-se positivas.

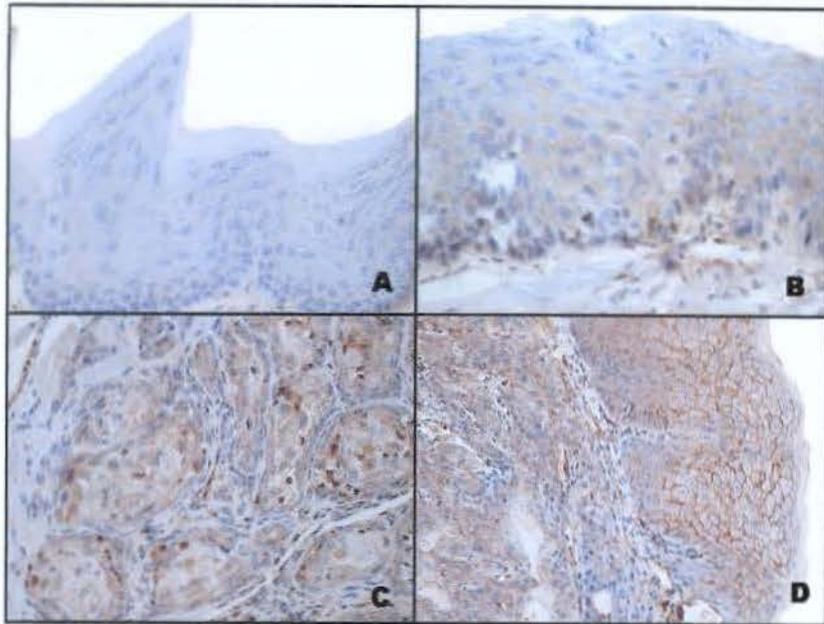
**TABELA 15:** Intensidade de imunomarcaco nos casos que apresentaram positividade para o anticorpo anti-Skp2-B (nmero de casos analisados) no epitelo normal, displsico e no carcinoma.

	Epitelo Normal	Displasia Leve	Displasia Moderada	Displasia severa Carcinoma in situ	Carcinoma
<b>1*</b>	0,0% (0)	46,7% (7)	41,7% (5)	70,0% (7)	40,0% (4)
<b>2*</b>	50,0% (2)	46,7% (7)	50,0% (6)	20,0% (2)	50,0% (5)
<b>3*</b>	50,0% (2)	6,6% (1)	8,3% (1)	10,0% (1)	10,0 % (1)
<b>Total</b>	<b>100% (4)</b>	<b>100% (15)</b>	<b>100% (12)</b>	<b>100% (10)</b>	<b>100% (10)</b>

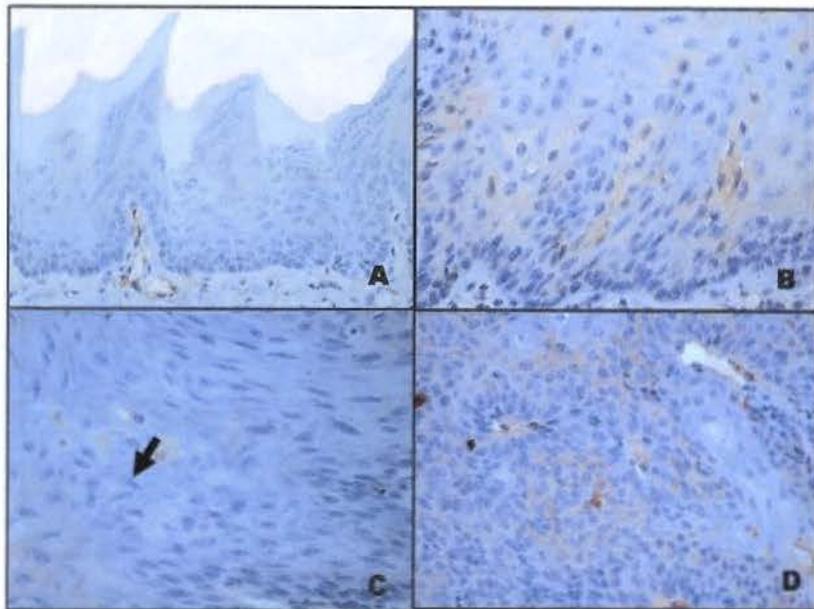
**NOTA:** \* Escores atribudos: (1) quando a intensidade de marcao foi fraca, (2) marcao de intensidade moderada e (3) marcao intensa.



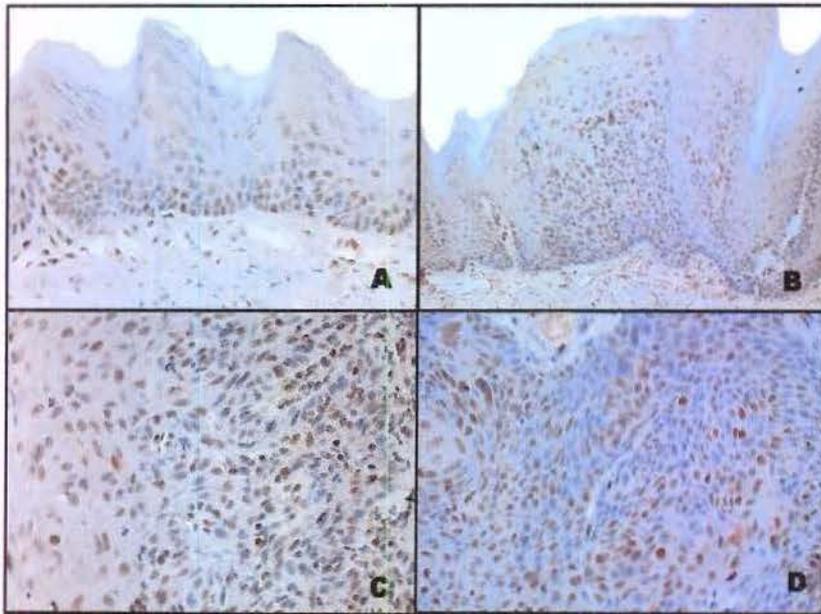
**Figura 13:** Aspecto imunohistoqumico para marcao anti-Ki-67. Em (A) lngua normal exibindo baixa proliferao celular (400X). A imagem (B) mostra uma intensa marcao anti-Ki-67 na camada basal do epitelo com displasia leve (200X). Em (C) epitelo com displasia moderada e em (D) um carcinoma espinocelular invasivo, exibindo entre 10% e 50% das clulas positivas para o referido anticorpo (200X).



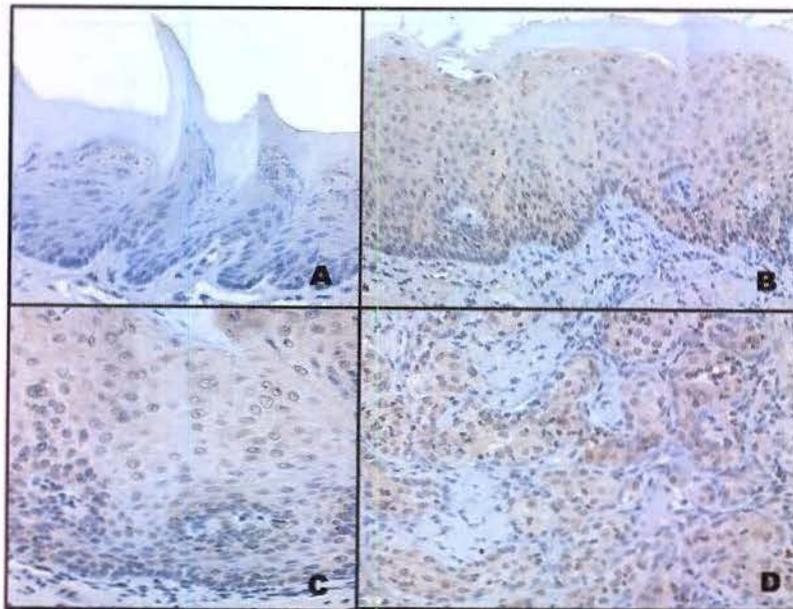
**Figura 14:** Aspecto imunohistoquímico para marcação anti-ErbB-2. Em (A) língua normal não exibindo imunomarcação (400X). A imagem (B) mostra marcação predominantemente membranosa em epitélio com displasia moderada (400X). Em (C) o tumor exibe marcação predominantemente citoplasmática e em (D) o carcinoma espinocelular invasivo mostra marcação citoplasmática e as áreas epiteliais adjacentes exibem marcação em membrana (200X).



**Figura 15:** Aspecto imunohistoquímico para marcação anti-FAS. Em (A) língua com epitélio normal e sem imunomarcação (400X). A imagem (B) mostra displasia leve com áreas aleatoriamente marcadas e com diferentes intensidades de imunomarcação (400X). Em (C) área de carcinoma espinocelular com baixa imunomarcação, notar célula bem marcada (400X) e em (D) carcinoma espinocelular invasivo, exibindo entre 10% e 50% das células positivas para o referido anticorpo (200X).



**Figura 16:** Aspecto imunohistoquímico para marcação anti-p27. Em (A) língua de camundongo não tratado com 4NQO, observa-se marcação predominantemente nas camadas basais e suprabasais (400X). A imagem (B) mostra intensa marcação anti-p27 em epitélio com displasia leve (200X). Em (C) epitélio com displasia severa/carcinoma *in situ* e em (D) carcinoma espinocelular invasivo, exibindo intensa imunomarcação anti-p27 (400X).

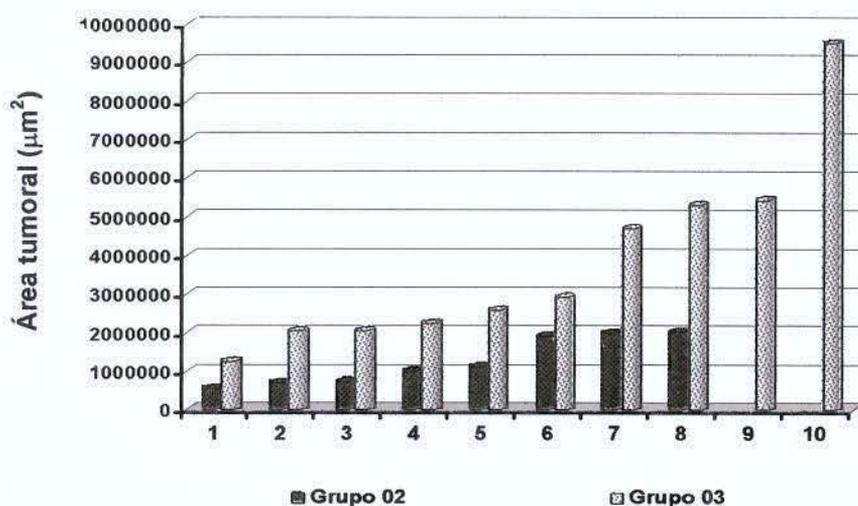


**Figura 17:** Aspecto imunohistoquímico para marcação anti-Skp2-B. Em (A) epitélio normal obtido de camundongos que não foram expostos ao 4NQO, sem imunomarcação aparente (400X). A imagem (B) mostra epitélio com displasia leve (200X) e em (C) epitélio com displasia moderada (400X), ambos exibindo intensa marcação citoplasmática anti-Skp2-B. Em (D) carcinoma espinocelular invasivo, mostrando ilhas tumorais intensamente imunomarcadas contra a proteína Skp2-B (400X).

### 5.3 EFEITO DO ORLISTAT:

O efeito do Orlistat sobre o processo de carcinogênese foi verificado através dos camundongos do grupo experimental 02, os quais receberam injeção intraperitoneal de Orlistat diariamente (240 mg/Kg/dia) durante os 15 dias anteriores ao sacrifício. Ao todo foram identificados oito carcinomas espinocelulares que se desenvolveram na língua de 5 animais. Como grupo controle foram utilizados os dez carcinomas espinocelulares presentes nos cinco camundongos do grupo experimental 03, os quais não foram tratados com Orlistat.

A área tumoral dos carcinomas espinocelulares obtidos de animais tratados ou não com Orlistat foi determinada nos cortes histológicos corados em Hematoxilina e Eosina (conforme descrito em material e métodos). A área média dos tumores presentes nos camundongos do grupo 02 (tratado com Orlistat) foi de  $1.248.073,12 \mu\text{m}^2$  (variando de  $551.612,81$  a  $2.004.138,23 \mu\text{m}^2$ ; desvio padrão de  $619.358,55 \mu\text{m}^2$ ), enquanto a área média tumoral nos camundongos do grupo 03 foi de  $3.811.551,74 \mu\text{m}^2$  (variando de  $1.275.406,90$  a  $9.504.499,8 \mu\text{m}^2$ ; desvio padrão de  $2.483.462,50 \mu\text{m}^2$ ), como pode ser observado na figura 18. Logo, a área tumoral nos animais tratados com Orlistat foi, em média, 67,25% inferior à área tumoral presente nos camundongos que não receberam terapia com Orlistat (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0010$ ).



**Figura 18:** O gráfico exibe áreas tumorais, em  $\mu\text{m}^2$ , dos carcinomas espinocelulares de camundongos que foram tratados com Orlistat (Grupo 02) ou não (Grupo 03), classificados em ordem crescente.

A expressão das proteínas nucleares não histônicas, as quais se ligam ao anticorpo Ki-67, foi menor nos tumores obtidos de camundongos tratados com Orlistat (Tabela 16), sendo o índice médio de proliferação celular de 2,58% (desvio padrão de 3,9), além de 62,5% dos casos analisados não apresentarem nenhuma imunomarcagem na área tumoral. Por outro lado, os tumores obtidos de camundongos não tratados com Orlistat tiveram índice médio de proliferação celular de 23,28% (desvio padrão de 16,9). Portanto, observou-se redução na proliferação celular, estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0077$  – Anexo 03), com o uso do Orlistat (Figura 19). Já a intensidade de marcação para o anticorpo Ki-67 foi mais fraca nos animais tratados com Orlistat, quando comparada aos animais que não receberam este tipo de tratamento (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0235$ ), conforme exibido na tabela 17.

A expressão do receptor de membrana ErbB-2 foi menor nos tumores que tiveram inibição da FAS, pois apresentaram menos de 50% de células positivas para ErbB-2, ao passo que a maioria dos carcinomas obtidos no grupo experimental 03 tiveram mais de 50% de células positivas (Tabela 16). No entanto, isto não representou diferença estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney,  $p=0,3284$ ). Além disso, a intensidade de marcação também não diferiu entre os grupos (Teste Mann-Whitney,  $p=0,4772$ ), predominando a intensidade de imunomarcagem entre fraca e moderada (Tabela 17).

Somente 25% dos carcinomas espinocelulares presentes nos animais do grupo experimental 02 tiveram marcação positiva anti-FAS (Tabela 16), por outro lado, 60% dos tumores presentes no grupo 03 foram positivos para FAS. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney,  $p=0,1826$ ). Todos os casos analisados, em ambos os grupos experimentais, exibiram intensidade de imunomarcagem fraca anti-FAS (Teste Mann-Whitney,  $p=0,2135$ ).

A proteína p27 teve expressão diminuída nos carcinomas espinocelulares de animais tratados com Orlistat (Tabela 16), onde a maioria dos casos (87,5%) apresentou-se com menos de 50% de células positivas (Figura 20).

Os carcinomas espinocelulares do grupo experimental 03 tiveram em média 53,55% (desvio padrão de 21,55) de células positivas para p27, enquanto o índice médio de positividade celular nos carcinomas do grupo experimental 02 foi de 30,19% (desvio padrão de 53,47) (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0077$ ). Em ambos os grupos predominaram imunomarcção nuclear de intensidade moderada (Teste Mann-Whitney,  $p=0,1551$ ).

Os carcinomas espinocelulares obtidos nos grupos experimentais 02 e 03 exibiram marcação exclusivamente citoplasmática para Skp2, denominada de Skp2-B. O tratamento com Orlistat ocasionou redução na expressão desta proteína (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0019$ ), sendo que 50% dos carcinomas obtidos de animais tratados com Orlistat não tiveram imunomarcção para Skp2-B (Figura 21). Já 70% dos carcinomas espinocelulares obtidos em camundongos do grupo 03 exibiram mais da metade de suas células positivas para Skp2-B, conforme apresentado na tabela 16. A imunomarcção anti-Skp2-B de intensidade fraca predominou nas áreas tumorais do grupo 02 (Tabela 17), enquanto a imunomarcção de intensidade moderada foi predominante no grupo experimental 03, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Teste Mann-Whitney,  $p=0,0145$ ).

Um achado casual foi à diminuição na espessura epitelial evidenciada na mucosa da língua de um dos camundongos do grupo experimental 02 (Figura 22). Além disso, não houve imunomarcção para Ki-67 em nenhuma área do tecido epitelial nesta amostra, indicando a sua baixa capacidade de proliferação.

**TABELA 16:** Distribuição dos casos de acordo com o número de células positivas para Ki-67, ErbB-2, FAS, p27 e Skp2-B em carcinomas espinocelulares obtidos de camundongos tratadas com Orlistat (Grupo 02) ou não (Grupo 03).

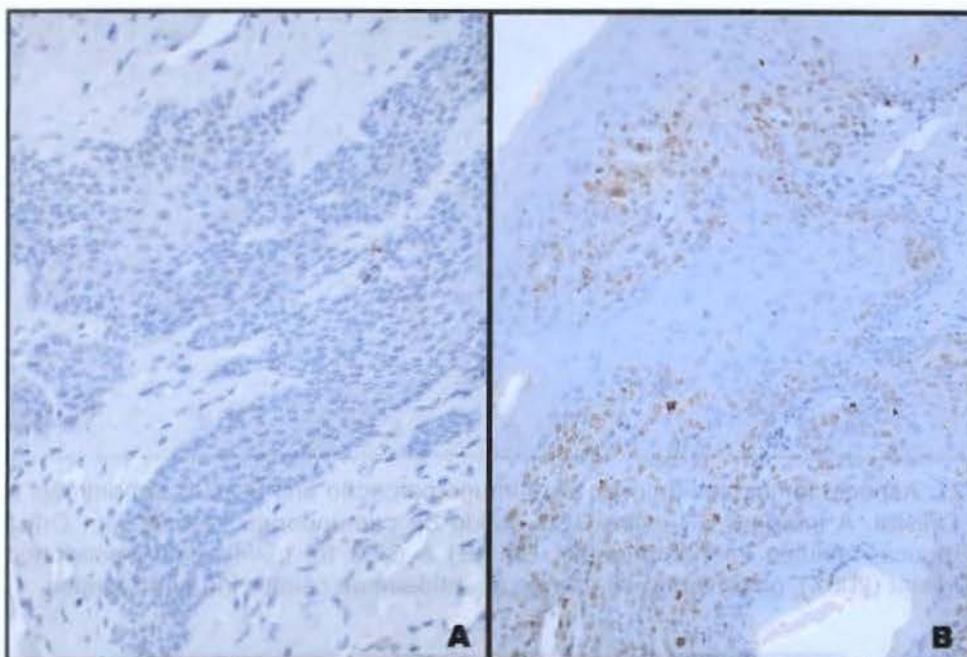
	Ki-67		ErbB-2		FAS		p27		Skp2-B	
	Grupo 02	Grupo 03								
0*	62,5% (5)	10,0% (1)	12,5% (1)	0,0% (0)	75,0% (6)	40,0% (4)	0,0% (0)	0,0% (0)	50,0% (4)	0,0% (0)
1*	37,5% (3)	30,0% (3)	0,0% (0)	0,0% (0)	12,5% (1)	30,0% (3)	25,0% (2)	0,0% (0)	25,0% (2)	10,0% (1)
2*	0,0% (0)	50,0% (5)	50,0% (4)	40,0% (4)	12,5% (1)	10,0% (1)	62,5% (5)	30,0% (3)	25,0% (2)	20,0% (2)
3*	0,0% (0)	10,0% (1)	37,5% (3)	60,0% (6)	0,0% (0)	20,0% (2)	12,5% (1)	70,0% (7)	0,0% (0)	70,0% (7)
<b>TOTAL</b>	<b>100% (8)</b>	<b>100% (10)</b>								

NOTA: \* Escores atribuídos: (0) quando não houve imunomarcacão, (1) quando menos de 10% das células foram positivas, (2) quando o número de células positivas variou entre 10% e 50% e (3) quando mais de 50% das células apresentaram-se positivas.

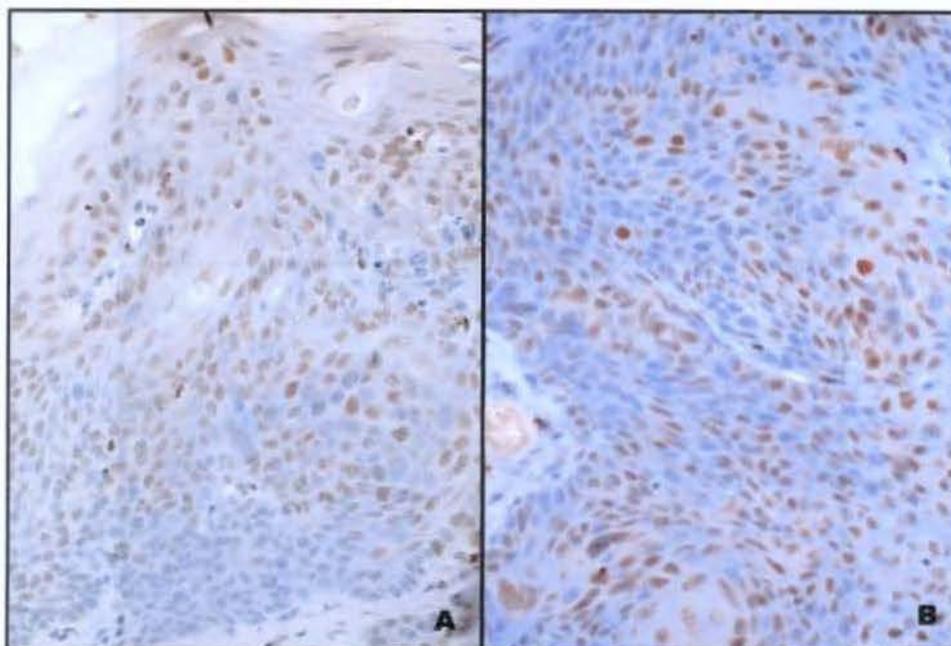
**TABELA 17:** Intensidade de imunomarcacão nos casos com positividade para o anticorpo anti-Ki-67, anti-ErbB-2, anti-FAS, anti-p27 e anti-Skp2-B em carcinomas espinocelulares obtidos de camundongos tratadas com Orlistat (Grupo 02) ou não (Grupo 03).

	Ki-67		ErbB-2		FAS		p27		Skp2-B	
	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 02	Grupo 03	Grupo 02	Grupo 03
1*	100% (3)	66,7% (6)	42,9% (3)	30,0% (3)	100% (2)	100% (6)	37,5% (3)	10,0% (1)	75,0% (3)	40,0% (4)
2*	0,0% (0)	33,3% (3)	42,9% (3)	60,0% (6)	0,0% (0)	0,0% (0)	62,5% (5)	70,0% (7)	25,0% (1)	50,0% (5)
3*	0,0% (0)	0,0% (0)	14,2% (1)	10,0% (1)	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)	20,0% (2)	0,0% (0)	10,0% (1)
<b>TOTAL</b>	<b>100% (3)</b>	<b>100% (9)</b>	<b>100% (7)</b>	<b>100% (10)</b>	<b>100% (2)</b>	<b>100% (6)</b>	<b>100% (8)</b>	<b>100% (10)</b>	<b>100% (4)</b>	<b>100% (10)</b>

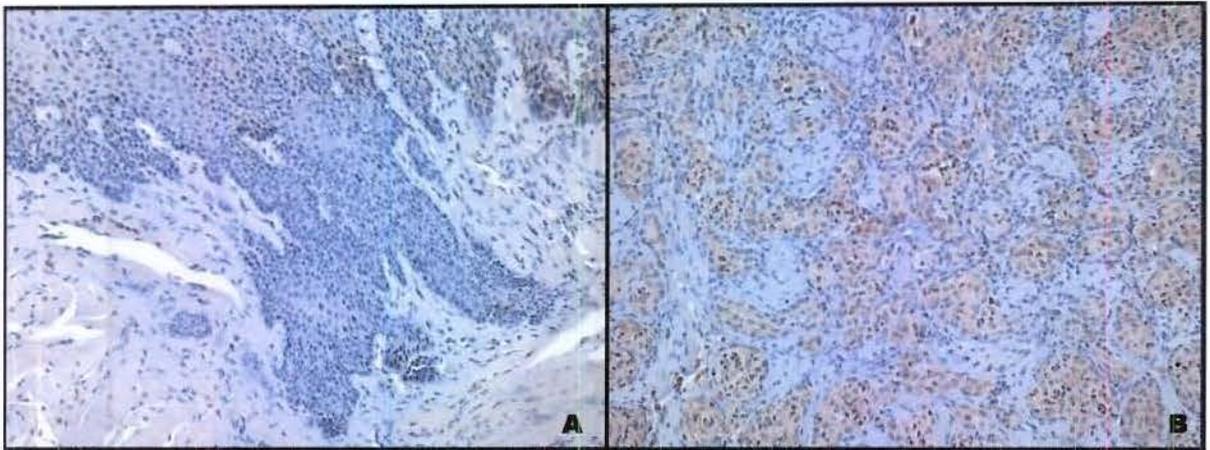
NOTA: \* Escores atribuídos: (1) quando a intensidade de marcação foi fraca, (2) marcação de intensidade moderada e (3) marcação intensa.



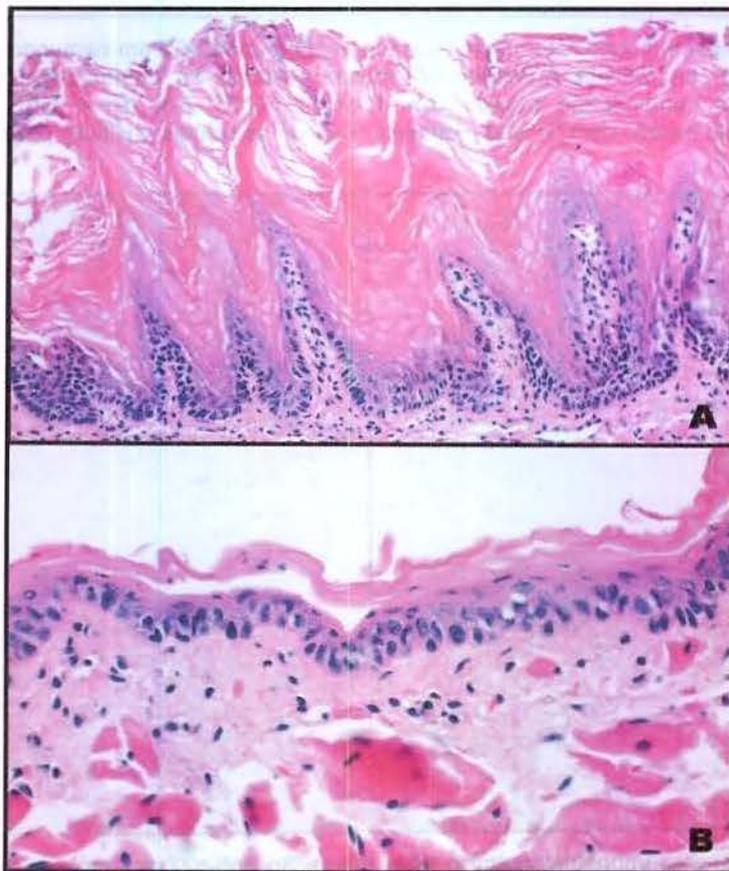
**FIGURA 19:** Aspecto imunohistoquímico para marcação anti-Ki-67 em camundongos que foram tratados ou não com Orlistat. A imagem (A) mostra ausência de imunomarcagem anti-Ki-67 em CEC obtido de camundongo tratado com Orlistat (400X). Em (B) o CEC foi obtido de camundongo não tratado com Orlistat e observam-se várias células positivas para Ki-67 (200X).



**FIGURA 20:** Aspecto imunohistoquímico para marcação anti-p27 em animais tratados ou não com Orlistat. A imagem (A) mostra CEC de camundongo tratado com Orlistat (400X). Em (B) o CEC foi obtido de camundongo não tratado com Orlistat (400X), observando-se maior quantidade de células imunomarcadas quando comparado à imagem A.



**FIGURA 21:** Aspecto imunohistoquímico para imunomarcção anti-Skp2-B em animais tratados ou não com Orlistat. A imagem (A) exibe CEC obtido de camundongo tratado com Orlistat (200X), notam-se poucas células imunomarcadas. Em (B) o CEC foi obtido de camundongo que não recebeu Orlistat (200X), observando-se grande quantidade de células imunomarcadas.



**FIGURA 22:** Atrofia epitelial encontrada em um dos camundongos que recebeu Orlistat. A imagem (A) corresponde à superfície dorsal da língua e (B) corresponde à mucosa ventral da língua. (HE, 400X).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1. Modelo animal

O processo de carcinogênese bucal é um processo multifatorial e requer o acúmulo de múltiplas alterações genéticas nas células epiteliais (Califano *et al.*, 2000). Durante este processo podem ocorrer várias mudanças teciduais como hiperplasia, displasias e finalmente o tumor (Kanojia & Vaidya, 2006). No entanto, o estudo histopatológico rotineiro não é suficiente para prever o real potencial de malignização de uma lesão que apresente áreas displásicas. Por isso numerosas investigações tentam padronizar exames mais específicos que permitam detectar as alterações celulares ainda no nível molecular (Küstner *et al.*, 2004). A melhor compreensão das vias moleculares envolvidas no processo de carcinogênese auxiliaria nas terapias empregadas (Kim & Califano, 2004), bem como, na prevenção do câncer, evitando o seu desenvolvimento (Kanojia & Vaidya, 2006; Küstner *et al.*, 2004).

Para tanto, modelos animais são necessários para a realização destes estudos. Numerosos agentes químicos têm sido empregados na carcinogênese bucal experimental, dentre eles destaca-se o 1-óxido 4-nitroquinolina (4NQO) (Nakahara *et al.*, 1957; Everson, 1981; Nauta *et al.*, 1995, Tang *et al.*, 2004; Kanojia & Vaidya, 2006; Sioga *et al.*, 2006; Suzuki, 2006), que quando administrado juntamente com a água fornecida aos animais é um potente agente indutor de câncer de boca. Diversas pesquisas têm empregado diferentes concentrações de 4NQO e tempo de exposição ao agente cancerígeno (Tanaka *et al.*, 1994; Li, 2000; Sato *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2006; Zang *et al.*, 2006). Nesse estudo, o agente carcinogênico utilizado foi o 4NQO, dissolvido na água fornecida aos camundongos na concentração de 100 µg/ml. Os animais foram expostos ao agente carcinogênico por 16 semanas e após esse período passaram a receber somente água, conforme proposto por Tang *et al.* (2004). Este modelo animal foi escolhido devido à facilidade de indução, execução

e aos bons resultados que são obtidos, conforme já descritos na literatura (Liu *et al.*, 1999; Li, 2000; Suzuki *et al.*, 2006; Zang *et al.*, 2006).

As alterações clínicas mais evidentes foram encontradas na língua, a qual apresentava áreas leucoplásicas, lesões exofíticas e alterações na superfície lingual tornando-a rugosa. Somente um animal apresentou lesão exofítica no palato. Esses achados estão de acordo com Tang *et al.* (2004), os quais relataram ausência de lesão clinicamente agressiva em outras áreas da mucosa bucal, exceto na superfície da língua. Esse fato pode ser justificado devido a língua ser a região mais exposta ao carcinógeno. Áreas leucoplásicas também foram relatadas por Nauta *et al.* (1995) e são justificadas pela intensa hiperqueratinização evidenciada histologicamente.

Como esperado, os camundongos do grupo 01 (controle) não desenvolveram carcinomas espinocelulares na língua, ao contrário dos animais dos grupos experimentais 02 e 03, onde todos apresentaram carcinomas espinocelulares na língua. Esses dados foram semelhantes aos encontrados por Tang *et al.* (2004), os quais observaram que todos os camundongos tratados com 4NQO por 16 semanas e acompanhados por mais 12 semanas desenvolveram carcinomas espinocelulares na língua. Já Liu *et al.* (1999) verificaram que 77,8% dos ratos tratados com 4NQO (200 µg/ml) por 16 semanas tiveram carcinomas espinocelulares na língua. Niwa *et al.* (2001) relataram que 70% dos animais, quando expostos ao 4NQO (concentração de 5 ppm), apresentaram carcinomas em 20 semanas e 80% dos animais exibiram carcinomas espinocelulares na 25ª semana.

Os carcinomas encontrados neste estudo foram bem diferenciados e invadiam a submucosa e/ou a camada muscular, sendo as lesões tanto exofíticas quanto endofíticas. Esses achados estão de acordo com a literatura consultada (Tanaka *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1999; Niwa *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Nauta *et al.* (1995) concluíram que a exposição ao 4NQO resulta em carcinoma espinocelular com excessiva formação de queratina, diferindo de lesões em humanos, onde o carcinoma apresenta-se com vários graus de diferenciação. Sioga *et al.* (2006) ressaltaram que a intensa queratinização é uma

característica cardinal no desenvolvimento do câncer bucal induzido por 4NQO em modelos animais.

Múltiplas lesões foram freqüentemente encontradas na língua, sendo estas totalmente independentes. Além disso, áreas displásicas adjacentes ao tumor também puderam ser observadas. Esse fato já havia sido relatado por Sato *et al.* (2002) e Tang *et al.* (2004), confirmando o conceito de cancerização em campo. As alterações celulares e arquiteturais observadas nas áreas displásicas foram semelhantes às identificadas no ser humano. Nauta *et al.* (1995) afirmaram que as displasias epiteliais induzidas quimicamente por 4NQO no palato de ratos assemelham-se às displasias epiteliais da mucosa bucal humana, com exceção das características de projeção em gota, estratificação irregular do epitélio, disqueratose e perda da aderência intercelular.

Os camundongos pertencentes aos grupos experimentais 04, 05 e 06 tiveram menor incidência de carcinomas espinocelulares quando comparado aos camundongos do grupo experimental 03, porém apresentavam várias áreas displásicas. Niwa *et al.* (2001) e Tang *et al.* (2004) não identificaram carcinomas em animais tratados com 4NQO até a 16<sup>o</sup> semana, ao contrário dos resultados obtidos nesse estudo, pois um camundongo do grupo 06 desenvolveu carcinoma espinocelular.

Há relatos na literatura descrevendo marcada reação inflamatória em epitélios bucais expostos a carcinógenos potentes, tais como o 4NQO, (Nauta *et al.*, 1995). Apesar disto, nenhuma das amostras deste trabalho exibiu reação inflamatória intensa, concordando com os resultados de Tang *et al.* (2004).

Os animais que foram expostos ao 4NQO (100 µg/ml) tiveram uma acentuada perda de peso em relação ao grupo controle, o qual somente recebeu água acrescida com propilenoglicol por 16 semanas. Esse fato também já havia sido relatado por Tang *et al.* (2004) e Kanojia & Vaidya (2006).

O Orlistat, apesar de ser uma droga utilizada para controle da obesidade, não foi capaz de induzir perda de peso significativa quando administrada via intraperitoneal, pois os camundongos tratados com Orlistat (grupo experimental 02) apresentaram pesos semelhantes aos camundongos que não receberam Orlistat (grupo experimental 03). Este fato também foi observado por

Carvalho (2007), o qual não encontrou diferença significativa no peso dos animais que receberam ou não tratamento com Orlistat durante 13 dias. Kridel *et al.* (2004) injetaram intraperitonealmente 240 mg/kg/dia de solução de Orlistat, durante um período de três semanas, em camundongos inoculados com células de tumores de próstata (PC-3) e não observaram qualquer sinal externo de toxicidade, perda de peso ou alterações hematológicas.

A sobrevivência dos camundongos, neste estudo, foi de 97,3%, sendo que somente um animal foi a óbito durante o experimento. Resultados similares já haviam sido obtidos por Tang *et al.* (2004), com 80% de sobrevivência dos animais. No entanto, esses autores acompanharam os animais por mais 12 semanas após a exposição ao 4NQO, o qual havia sido fornecido durante 16 semanas. Já os camundongos utilizados nessa pesquisa foram observados somente por 2, 4 e 9 semanas após o término de exposição com 4NQO, o que justifica a taxa de sobrevivência ser ligeiramente mais alta.

Os resultados desta pesquisa demonstraram que a administração de 4NQO juntamente com a água fornecida aos animais por 16 semanas é um método eficaz para o estudo do processo de carcinogênese bucal, pois, além de induzir a formação de tumores, produz alterações displásicas bastante similares às encontradas no ser humano. A simplicidade de execução e o baixo índice de mortalidade dos animais são vantagens adicionais desta metodologia.

## **6.2 Processo de carcinogênese bucal**

Vários genes são responsáveis pela manutenção da homeostasia celular. No entanto, quando há mutações nesses genes, ocorre alteração na regulação do ciclo celular, o que contribui para o desenvolvimento e progressão do carcinoma espinocelular (Choi *et al.*, 2003).

O anticorpo Ki-67 liga-se a proteínas nucleares não histônicas presentes em todos os estágios do ciclo celular, exceto na fase G0 (Gerdes *et al.*, 1991; Gonzáles-Moles *et al.*, 1996). Isso permite determinar a atividade proliferativa das células tanto em situações normais como em condições patológicas (Ito *et al.*,

1998; Birner *et al.*, 2001). Apesar de bastante utilizado como marcador de proliferação celular, a sua utilização no estabelecimento do prognóstico de carcinomas espinocelulares de boca é ainda controversa, uma vez que baixas taxas de proliferação podem ocorrer em tumores bem diferenciados e com recorrências locais precoces (Aguiar *et al.*, 2007).

A marcação observada para o anticorpo Ki-67 neste estudo foi exclusivamente nuclear e ocorreu em epitélio normal, displásico ou tumoral, como já relatado na literatura (González-Moles *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Birner *et al.*, 2001; Tumuluri *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2006; Aguiar *et al.*, 2007). No entanto, o epitélio normal apresentou em média 4,31% de células imunomarcadas com o anticorpo Ki-67, sendo a marcação restrita a camada basal e parabasal; em concordância com Liu *et al.* (1998). Por outro lado, áreas displásicas e tumorais apresentaram proliferação celular aumentada quando comparadas ao tecido normal, pois nessas regiões mais que 20%, em média, das células foram positivas para o anticorpo Ki-67. A positividade celular foi observada na camada basal, espinhosa e superficial, concordando com a literatura consultada (Zoeller *et al.*, 1994; Kushner *et al.*, 1997; Oliver & MacDonald, 2001; Piatteli *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2006). Porém os diversos graus de displasia não diferiram entre si com relação à taxa de proliferação celular. Sato *et al.* (2002) exibiram dados semelhantes, com índices de imunomarcação para Ki-67 significativamente maiores em displasias e estágios iniciais de câncer que em áreas histologicamente normais. O índice de proliferação nas áreas displásicas foi de 31,5% ( $\pm 7,0\%$ ) e de 33,1% ( $\pm 4,0\%$ ) nas áreas de carcinoma, não havendo diferença estatisticamente significante entre os índices.

A taxa média de proliferação celular nos carcinomas espinocelulares dos animais do grupo experimental 03 foi de 23,28% (variando de 2,6% a 49,1%), taxas similares foram obtidas por Tsuji *et al.* (1992) com média de 24,1% (variação de 4,9% a 40%) e por Roland *et al.* (1994) cuja média foi 27,8%. O padrão de marcação foi bastante variável, pois 3 casos (30%) apresentaram menos de 10% de células positivas e um caso (10%) não apresentou marcação anti-Ki-67. Essa variação na expressão de imunomarcação já tinha sido relada por Kearsley *et al.* (1990) e González-Moles *et al.* (1996), os quais observaram ligeira expressão anti-

Ki-67 em 35,8% e 36,5% dos casos analisados, respectivamente. Alta proliferação celular foi verificada somente em um caso (10%), estando de acordo com a literatura (Kearsley *et al.*, 1990; Roland *et al.*, 1994; Gonzáles-Moles *et al.*, 1996). Além disso, observou-se imunomarcção mais intensa na periferia ou no fronte invasivo do tumor, como apontado por Niwa *et al.* (2001) e Choi *et al.* (2003).

O aumento na intensidade de imunomarcção para o anticorpo Ki-67 foi verificado em áreas de displasia leve, moderada e severa, quando comparado ao tecido normal e ao carcinoma invasivo, os quais apresentaram intensidade de marccção predominantemente fraca. Portanto, áreas displásicas exibiram uma maior proliferação celular e imunomarcção mais intensa para Ki-67, quando comparadas ao tecido normal.

A FAS é a enzima metabólica responsável pela síntese endógena de ácidos graxos saturados (Kuhajda *et al.*, 2000; Chirala *et al.*, 2001; Brink *et al.*, 2002), logo níveis elevados desta enzima proporcionam vantagens seletivas para o crescimento celular (Baron *et al.*, 2004). Vários estudos têm apontado aumento na expressão da FAS em diversas neoplasias malignas (Visca *et al.*, 1999; Alo *et al.*, 2000; Piyathilake *et al.*, 2000; Kusakabe *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2001; Innocenzi *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2003; Takahiro *et al.*, 2003), inclusive no carcinoma espinocelular de boca (Krontiras *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2003; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004). De modo geral, os tumores que expressam grandes quantidades de FAS apresentam comportamento biológico mais agressivo quando comparados àqueles que possuem níveis normais (Baron *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Portanto, a atividade biológica da FAS é um possível alvo terapêutico no tratamento do câncer, pois está diretamente ligada à síntese de ácidos graxos, necessários à progressão do ciclo celular (Kuhajda *et al.*, 2000; Swinnen *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2003; Kumar-Sinha *et al.*, 2003).

Os dados deste estudo revelaram que 60% dos carcinomas espinocelulares analisados tiveram expressão aumentada de FAS, confirmando os achados de Krontiras *et al.* (1999); Guo *et al.* (2003) e Agostini *et al.* (2004). Silva *et al.* (2004), através de imunohistoquímica, verificou que 77,4% dos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço expressavam FAS. Além disso, estes autores afirmaram que a expressão aumentada de FAS foi verificada

principalmente em carcinomas bem diferenciados, como ocorre neste experimento. Não houve, entretanto, associação entre o potencial proliferativo do tumor e a imunomarcacão para FAS. Além disso, os pesquisadores observaram que a expressão da FAS no epitélio normal, quando ocorre, está restrita às células da camada basal. Já áreas com displasia epitelial moderada ou severa apresentaram imunopositividade em todas as células da camada espinhosa.

Aumento gradativo na expressão da FAS com a progressão do quadro displásico foi encontrado, mas só houve diferença estatisticamente significativa entre o epitélio normal e as áreas de displasia severa e tumoral, corroborando com os achados de Krontiras *et al.* (1999). Estes autores verificaram aumento na produção desta enzima em displasias epiteliais e carcinomas espinocelulares de língua, em relação ao epitélio adjacente morfologicamente normal, e sugeriram que o aumento na expressão da FAS pode ser considerado como marcador para mudanças neoplásicas precoces.

Os diversos graus de displasia não diferiram entre si e nem do carcinoma invasivo quando se comparou de forma semiquantitativa a imunomarcacão para FAS. Nemoto *et al.* (2001) encontraram positividade para FAS em 92,9% dos casos analisados de displasia esofágica e em 96,5% dos casos carcinomas em esôfago e sugeriram que o aumento na expressão pode ser evidenciado nos estágios precoces da carcinogênese esofágica.

A intensidade de marcação foi predominantemente fraca em todos os graus de displasias e no carcinoma invasivo. Nenhum dos casos exibiu intensidade de imunomarcacão forte. Isto pode ser justificado devido a diferenças na expressão desta enzima de acordo com a origem dos tecidos estudados. Esse foi o primeiro estudo que avaliou a expressão de FAS em carcinomas espinocelulares e áreas displásicas induzidas por 4NQO em camundongos. No entanto, Agostini *et al.* (2004), ao estudarem diferentes linhagens celulares de carcinoma espinocelular de boca, verificaram que a enzima FAS é diferencialmente produzida pelas linhagens, sendo que as linhagens SCC-9 e SCC-25 apresentavam maior expressão de FAS quando comparada às linhagens SCC-4 e SCC-15.

Baseado nos dados desta pesquisa pode-se afirmar que ocorre pequeno aumento na expressão da FAS já nos estágios iniciais do processo de carcinogênese. Entretanto, mais estudos clínico-patológicos devem ser realizados para elucidar com maior precisão a participação desta enzima no processo de carcinogênese bucal.

O ErbB-2 faz parte da família dos receptores celulares ErbB, envolvidos no processo de crescimento, diferenciação e migração celular (Kolibaba & Druker, 1997). Em condições fisiológicas normais, o receptor ErbB-2 somente é ativado após a heterodimerização com outros receptores da família ErbB, promovendo amplo espectro de atividades biológicas (Holbro *et al.*, 2003). Nos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço, este receptor modula a proliferação, invasão e a expressão de metaloproteinasas (O-Chaorenrat *et al.*, 2002).

Pesquisas comprovaram que a expressão de ErbB-2 está aumentada em diversos tipos de cânceres, inclusive no carcinoma espinocelular de boca (Xia *et al.*, 1997; Wilkman *et al.*, 1998; Werkmeister *et al.*, 2000; Vora *et al.*, 2003; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Perea *et al.*, 2005). Os resultados obtidos nesta pesquisa também mostram alta expressão do receptor ErbB-2 em carcinomas espinocelulares de língua de camundongos expostos ao 4NQO, uma vez que todos os tumores apresentaram imunomarcagem tanto em membrana celular como citoplasmática.

Hou *et al.* (1992) e Kustner *et al.* (2004) verificaram que áreas displásicas possuem aumento na expressão de ErbB-2 e sugeriram que este receptor possa estar envolvido no desenvolvimento de câncer bucal desde os estágios iniciais. Baseado em nossos resultados concorda-se com os autores acima citados, pois o aumento na expressão do receptor ErbB-2 foi verificado já em áreas de displasia leve, mantendo-se alta em áreas com displasia moderada e severa. Além disso, pode-se concordar com os achados de Kumar-Sinha *et al.* (2003), os quais afirmaram que os receptores da família ErbB ativam vias intracelulares que medeiam a expressão de FAS. Os resultados desse estudo sugerem justamente isso, inicialmente houve aumento na expressão de ErbB-2 para em seguida notar elevação na expressão da FAS.

Vários trabalhos demonstraram que áreas adjacentes ao tumor, cujo epitélio possui características histológicas de normalidade, já apresentavam alterações na expressão do receptor ErbB-2 (Werkmeister *et al.*, 1999; Werkmeister *et al.*, 2000; Kustner *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004). Neste trabalho também foi observado que o epitélio lingual, com características histológicas de normalidade, de camundongos expostos ao 4NQO durante 16 semanas apresentava imunomarcção, citoplasmáticas e de membrana para ErbB-2. Werkmeister *et al.* (1999) afirmaram que áreas sem evidências de displasia já podem possuir alterações genéticas para ErbB-2. Estes achados reforçam o conceito de cancerização de campo.

Portanto, a expressão de ErbB-2 esteve aumentada desde os estágios iniciais no processo de carcinogênese (displasia leve) até o carcinoma espinocelular. Já a intensidade de imunomarcção não variou significativamente, prevalecendo à marcação de intensidade moderada à intensa.

A proteína p27 é um inibidor da quinase dependente de ciclina 2 (CDK2) e impede a progressão do ciclo celular, mantendo as células na fase G1 (Polyak *et al.*, 1994; Toyoshima & Hunter, 1994; Massagué, 2004). A concentração desta proteína diminui quando as células sofrem estímulos mitogênicos (Swanton, 2004). Logo, redução na quantidade da proteína p27 ocorre em diversas neoplasias malignas (Florenes *et al.*, 1998, Lloyd *et al.*, 1999; Tsihlias *et al.*, 1999; Slingerland & Pagano, 2000; Philipp-Staheli *et al.* 2001, Goto *et al.*, 2005), inclusive no carcinoma espinocelular de boca, estando correlacionado com pior prognóstico (Kudo *et al.*, 1998; Fujieda *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1999; Mineta *et al.*, 1999; Venkatesan *et al.*, 1999; Kuo *et al.*, 2002; Shintani *et al.*, 2002).

Os dados deste estudo revelaram alta expressão da proteína p27 em carcinomas espinocelulares de animais que foram expostos ao 4NQO, pois os tumores exibiram média de 53,55% de células imunomarcadas para p27 por campo analisado, resultado que difere dos encontrados na literatura consultada (Kudo *et al.*, 1998; Fujieda *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1999; Mineta *et al.*, 1999; Venkatesan *et al.*, 1999; Kuo *et al.*, 2002; Shintani *et al.*, 2002).

Porém Gstaiger *et al.* (2001) verificaram imunomarcção para p27 superior a 20% de núcleos positivos em carcinomas espinocelulares bem

diferenciados e concluíram que estes tumores tendem a exibir uma alta marcação para p27. Choi *et al.* (2003) afirmaram que a perda da expressão de p27 está associada à intensa proliferação celular e pobre diferenciação celular, o que não foi observado nos tumores deste trabalho.

Além disso, Kitajima *et al.* (2004) relataram uma linhagem de células de carcinoma espinocelular de boca humana (Ho-1-N-1) com alta expressão da proteína p27 e baixa expressão de Skp2 nuclear. Choi *et al.*, (2003) encontraram positividade para p27 que variou de 0 a 40%, sendo os maiores valores encontrados em carcinomas bem diferenciados. Goto *et al.* (2005) encontraram valores entre 10 e 50% de células imunomarcadas positivamente para p27 em 25,3% dos tumores analisados e entre 50 e 90% das células positivas em 3,3% dos casos estudados. Estes trabalhos demonstram que há grande diversidade biológica entre os carcinomas espinocelulares, com diferentes comportamentos celulares na dependência do agente mutagênico indutor.

Pulhez (2007) verificou que a expressão de p27 estava aumentada em carcinomas espinocelulares de pele quando comparados ao carcinoma espinocelular de lábio e boca, sugerindo que o comportamento mais agressivo destes últimos pode estar relacionado à baixa expressão desta proteína. Os tumores no presente estudo não foram agressivos, como evidenciado pela alta taxa de sobrevivência dos camundongos com carcinomas espinocelulares em língua.

Áreas com displasia tiveram aumento progressivo na quantidade de p27, conforme evoluía o processo de carcinogênese. A maior positividade celular foi verificada na displasia severa/carcinoma *in situ* e no carcinoma, quando comparados às áreas de displasia leve, moderada e epitélio normal. Estes achados também diferiram da literatura consultada, pois Kudo *et al.* (2005) e Choi *et al.* (2003), ao analisarem lesões displásicas encontraram diminuição nos níveis de p27 à medida que se aumentava a severidade da displasia. Porém a alta expressão de p27 encontrada nas áreas displásicas está de acordo com o que foi verificado nas células tumorais.

Também foi encontrada positividade para proteína p27 no epitélio normal, cujo índice de marcação ficou em torno de 11%. As células epiteliais imunomarcadas estavam localizadas nas camadas espinhosa e superficial, ou

seja, em células bem diferenciadas, corroborando com os achados de Choi *et al.* (2003).

A proteína Skp2 é uma ligase de ubiquitina responsável pelo reconhecimento, ubiquitinação e degradação da proteína p27 (Ganiatsas *et al.*, 2001; Gstaiger *et al.*, 2001; Kitajima *et al.*, 2004; Radke *et al.*, 2005). Durante a progressão tumoral, os níveis protéicos de Skp2 estão aumentados, favorecendo a progressão tumoral (Gstaiger *et al.*, 2001; Drobnyak *et al.*, 2003; Kitajima *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007). No entanto, a maioria dos estudos descreve e discute os níveis protéicos de Skp2 quando localizada no interior do núcleo, já a imunomarcagem obtida neste estudo ocorreu exclusivamente no citoplasma.

A Skp2 citoplasmática é a forma variante da proteína Skp2 nuclear, formada a partir de um *splice* alternativo do gene que codifica a proteína Skp2 (Ganiatsas *et al.*, 2001; Radke *et al.*, 2005). Poucos trabalhos relatam esta forma de Skp2, também chamada de Skp2-CTV ou Skp2-B, não havendo relatos na literatura pesquisada a respeito desta variante no carcinoma espinocelular de boca.

Foi possível observar aumento na expressão de Skp2-B ou Skp2-CTV nas áreas com displasias e carcinoma espinocelular quando comparadas ao epitélio normal. Não se encontrou diferença estatisticamente significativa na expressão desta forma da proteína entre áreas displásicas e de carcinoma. Outro achado interessante foi a intensidade de marcação nas áreas de displasia leve e severa, as quais tinham imunomarcagem mais fraca, quando comparadas ao epitélio normal, que exibiu intensidade de marcação entre moderada e intensa.

Embora se planejasse verificar a expressão de Skp2 nuclear, isso não foi possível. O primeiro anticorpo utilizado (Santa Cruz, clone H435 sc-7164 – diluição 1:20) não apresentou qualquer imunomarcagem, o que gerou dúvida quanto à razão da não marcação; se por falhas durante a reação de imunohistoquímica ou pela baixa expressão de Skp2 nuclear nos casos estudados, uma vez que o controle utilizado apresentava marcação bastante intensa. Entretanto, o tecido utilizado como controle foi originário de carcinoma espinocelular humano e as lesões experimentais foram de tecido animal.

Embora Gstaiger *et al.* (2001) tivessem relatado que carcinomas bem diferenciados tendem a exibir alta marcação para a proteína p27 e rara marcação para a proteína Skp2 nuclear, a dúvida permaneceu e optou-se pela aquisição de novo anticorpo (Zymed clone CA92008), que somente apresentou marcação no citoplasma das células.

Ganiatsas *et al.* (2001) e Radke *et al.* (2005) verificaram que a forma Skp2-CVT ou Skp2-B é superexpressa em linhagens de células de câncer uterino e de mama, respectivamente. Nós também encontramos aumento na expressão desta proteína nos tumores analisados neste estudo. Além disso, os autores acima citados concordam que a Skp2-CVT ou Skp2-B não é a responsável pela degradação da proteína p27, pois as alterações no domínio C-terminal impossibilitam a ubiquitinação da proteína p27, sugerindo que a sua ação deve ocorrer em outras proteínas. Os resultados do presente estudo concordam com esta sugestão, pois a forma variante de Skp2 teve a sua expressão aumentada já nas fases iniciais do processo de carcinogênese e manteve-se alta nas áreas de displasia moderada, severa e no carcinoma. Contudo, os níveis de p27 também aumentaram durante o processo de carcinogênese, confirmando a suspeita de que a proteína Skp2-B ou Skp2-CVT age sobre outras proteínas e não sobre p27.

### **6.3 Efeito do Orlistat**

Por ser expressa em diversas neoplasias malignas, dentre elas o carcinoma espinocelular de boca, a FAS pode ser útil para o desenvolvimento de drogas quimiopreventivas (Lu & Archer, 2005). Estudos já demonstraram que inibidores específicos da atividade de FAS são capazes de inibir a proliferação celular, através do bloqueio da síntese de DNA durante a fase S, e levar as células posteriormente à morte por apoptose (Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Heiligtag *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2003; Knowles *et al.*, 2004; Kridel *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005a). Agostini *et al.* (2004) mostraram que o bloqueio da atividade de FAS pela cerulenina inibe significativamente a proliferação de células derivadas de carcinoma espinocelular de boca.

O Orlistat, um derivado semi-sintético da lipostatina, atua inibindo as lipases gástricas e pancreáticas no trato gastrintestinal (Guerciolini *et al.*, 1997), porém esta droga também demonstrou efeito inibitório sobre a FAS (Kridel *et al.*, 2004). Knowles *et al.* (2004) e Kridel *et al.* (2004) relataram as propriedades antitumorais e antiproliferativas do Orlistat em modelo xenográfico de câncer de próstata e em linhagens de células derivadas de câncer de próstata e de mama. No presente trabalho, demonstrou-se pela primeira vez, o efeito do Orlistat no processo de carcinogênese bucal em modelo animal.

A injeção intraperitoneal do Orlistat atua de forma sistêmica, como demonstrado por Carvalho (2007), o qual realizou cortes por congelação e coloração por Oil Red "O" em tecido hepático de animais que receberam ou não injeção de Orlistat (240 mg/Kg/dia). Este pesquisador encontrou grande quantidade de gotículas de lipídios no citoplasma dos hepatócitos dos animais que não foram tratados com Orlistat. Por outro lado, os camundongos tratados com Orlistat exibiram coloração fraca e possuíam menor quantidade de gotículas de lipídios no interior dos hepatócitos, comprovando, deste modo, que a atividade da enzima FAS é efetivamente reduzida através das injeções intraperitoneais de Orlistat. Apesar do efeito sistêmico, nenhuma alteração indicativa de toxicidade foi notada nos camundongos que receberam Orlistat, como já verificado por Kridel *et al.* (2004).

Nesta pesquisa, constatou-se diminuição de 67,25% na área tumoral nos camundongos que receberam injeção intraperitoneal de Orlistat (240 mg/Kg/dia) durante 15 dias, quando comparado à área tumoral dos animais que não foram tratados com Orlistat. Este fato pode ser justificado pela baixa proliferação celular, com índice de imunomarcagem para Ki-67 de 2,68% nos tumores obtidos de animais que receberam Orlistat. Além disso, 62,5% das amostras analisadas tiveram ausência de imunomarcagem para Ki-67 na área tumoral. Estes achados estão de acordo com a literatura, a qual aponta que inibidores específicos da atividade de FAS bloqueiam a progressão do ciclo celular e inibem a proliferação de várias linhagens celulares derivadas de tumores malignos (Pizer *et al.*, 1998; Pizer *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2004;

Knowles *et al.*, 2004; Kridel *et al.*, 2004; Menendez *et al.* 2005; Zhang *et al.*, 2005; Carvalho, 2007).

A expressão do receptor ErbB-2 e da enzima FAS não diferiram significativamente entre os tumores de camundongos tratados ou não com Orlistat, embora maior número de tumores sem imunomarcagem para FAS estivesse presente em animais tratados com Orlistat. Os achados nesta pesquisa diferem parcialmente dos relatados em outros estudos, onde o Orlistat inibiu intensamente a expressão de ErbB-2 (Menendez *et al.*, 2005; Carvalho 2007). A não redução da expressão do receptor ErbB-2 pode ter ocorrido devido à dose administrada ser insuficiente para causar tal efeito ou devido ao pouco tempo entre a administração da droga e a morte dos camundongos. O mecanismo responsável por este fenômeno merece ser estudado com maiores detalhes em pesquisas futuras.

A expressão da proteína p27 diminuiu significativamente nos tumores derivados de camundongos tratados com Orlistat, conflitando com a literatura consultada, a qual descreve aumento na expressão de p27 com a inibição da FAS (Knowles *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005; Carvalho, 2007). Além disso, Knowles *et al.* (2004) demonstraram diminuição na expressão da proteína Skp2 nuclear, o que justifica o aumento na quantidade de p27 em células que tiveram a atividade da enzima FAS inibida. Como não se avaliou a expressão da Skp2 nuclear neste estudo, não há como estimar se houve aumento na degradação da proteína p27 ou diminuição na quantidade de RNA<sub>mensageiro</sub> desta proteína.

Foi verificada, entretanto, diminuição na expressão de Skp2 citoplasmática (Skp2-B ou Skp2-CVT) nos tumores derivados de animais que receberam injeção intraperitoneal de Orlistat. O Orlistat também causou redução na intensidade de marcação contra a proteína Skp2-B. Esta diminuição pode estar associada ao fato da proteína possuir efeito antiapoptótico (Radke *et al.*, 2005), pois o Orlistat através da inibição de FAS pode induzir as células a entrarem em apoptose (Pizer *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001; Heiligtag *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2003; Agostini *et al.*, 2004; Knowles *et al.*, 2004; Kridel *et al.*, 2004; Menendez *et al.*, 2005; Carvalho, 2007), desse modo, os níveis de proteínas antipoptóticas tendem a diminuir. No entanto, pesquisas adicionais são necessárias para melhor

entendimento desse processo, uma vez que esse foi o primeiro estudo que relatou o efeito do Orlistat sobre esta proteína.

Um achado interessante foi a diminuição na espessura do tecido epitelial em toda a extensão da língua em um dos camundongos que recebeu injeções intraperitoniais de Orlistat. Guo *et al.* (2003) demonstraram que a atividade da FAS é mais alta em amostras teciduais de carcinomas espinocelulares bucais do que em áreas adjacentes ao tumor ou de mucosa bucal clinicamente normal. No entanto, estes autores verificaram que a inibição da síntese de ácidos graxos pela cerulenina também ocorreu em amostras de mucosa clinicamente normal, ainda que em menor intensidade, quando comparada ao efeito em carcinoma espinocelular bucal. Além disso, Almeida *et al.* (2005) demonstraram que a cerulenina é capaz de inibir o crescimento de fibroblastos normais em cultura celular primária, sugerindo que a produção endógena de ácidos graxos é essencial para outros tipos celulares, além das células malignas.

Portanto, apesar dos resultados promissores, a inibição da FAS pelo Orlistat como uma alternativa no tratamento de neoplasias malignas deve ser interpretada com muita cautela e novos estudos fazem-se necessários para melhor compreensão do efeito do Orlistat, tanto sobre a enzima FAS, como sistemicamente.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que:

1. A forma variante de Skp2, chamada de Skp2-B ou Skp2-CVT está presente em carcinoma espinocelular e em áreas displásicas do epitélio bucal.
2. As áreas de carcinoma espinocelular de camundongos expostos ao 4NQO, apresentam aumento na proliferação celular, na expressão da proteína FAS, do receptor ErbB-2, da proteína p27 e da proteína Skp2-B ou Skp2-CVT quando comparadas ao tecido normal.
3. As áreas displásicas apresentaram maior índice de proliferação celular, demonstrado pelo anticorpo Ki-67; aumento na expressão da proteína FAS, do receptor ErbB-2, da proteína p27 e da proteína Skp2-B ou Skp2-CVT, quando comparadas ao tecido epitelial normal.
4. Aumento significativo na expressão do receptor ErbB-2 e da proteína Skp2-B ou Skp2-CVT foi evidenciado nas fases iniciais do processo de carcinogênese.
5. Os camundongos tratados com Orlistat apresentaram área tumoral 67,25% menor do que a área dos tumores obtidos de camundongos que não foram tratados com Orlistat.
6. O Orlistat induziu diminuição na proliferação celular e no número de células imunomarcadas contra a proteína p27 e Skp2-B ou Skp2-CVT.

## REFERÊNCIAS\*

- Agostini M, Silva S, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M, Graner E. Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol.* 2004; 40(7): 728-35.
- Aguiar FC, Kowalski LP, Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. *Oral Oncol.* 2007, 43(6): 593-601.
- Almeida JP, Coletta RD, Silva SD, Agostini M, Vargas PA, Bozzo L, Graner E. Proliferation of fibroblasts cultured from normal gingival and hereditary gingival fibromatosis is dependent on fatty acid synthase activity. *J Periodontol.* 2005; 76(2): 272-78.
- Alo PL, Visca P, Framarino ML, Botti C, Monaco S, Sebastiani V, Serpieri DE, Di Tondo U. Immunohistochemical study of fatty acid synthase in ovarian neoplasms. *Oncol Rep.* 2000; 7(6): 1383-8.
- Ayres M, Ayres Jr. M, Ayres DL. *BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas.* Belém, 2005.
- 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.
- Birner P, Ritz M, Musahl C, Knippers R, Gerdes J, Voigtländer T, Budka H, Hainfellner JA. Immunohistochemical detection of cell growth fraction in formalin-fixed and paraffin-embedded murine tissue. *Am J Pathol.* 2001; 158(6): 1991-6.
- Blain SW, Scher HI, Cordon-Cardo C, Koff A. p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2003; 3(2): 111-5.
- Bloom J, Pagano M. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol.* 2003; 13(1): 41-7.
- Brasil, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. *O câncer no Brasil.* Rio de Janeiro: INCA; 2003.
- Brasil, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. *Estimativa 2006: Incidência do câncer no Brasil.* Rio de Janeiro: INCA; 2005.
- Brasil, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. *Magnitude do Câncer no Brasil.* Rio de Janeiro: INCA; 2006.
- Brink J, Ludtke ST, Yang Chao-Yuh, Gu Zei-Wei, Wakil SJ, Chiu W. Quaternary structure of human fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(1): 138-43.
- Califano JA, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, Sidransky D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(2): 347-52.

---

\* De acordo com a norma de UNICAMP/FOP, baseadas na norma do *International Committee of Medical Journal Editors* – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Carvalho AC. Análise do papel da enzima Ácido Graxo Sintase no processo metastático de melanoma em modelo murino (B16F10/C57BL6) [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2007.

Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med*. 1997; 3(2): 227-30.

Chen TP, Chen CM, Chang HW, Wang JS, Chang WC, Hsu SI, Cho CL. Increased expression of Skp2 and phospho-MAPK/ERK1/2 and decreased expression of p27 during tumor progression of cervical neoplasms. *Gynecol Oncol*. 2007; 104(3): 516-23.

Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, Finegold M, Wakil SJ. 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 USA*. 2003; 100(11): 6358-63.

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

Choi HR, Tucker SA, Huang Z, Gillenwater AM, Luna MA, Batsakis JG, El-Naggar AK. Differential expressions of cyclin-dependent kinase inhibitors (p27 and p21) and their relation to p53 and Ki-67 in oral squamous tumorigenesis. *Int J Oncol*. 2003; 22(2): 409-14.

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

Conway DI, Macpherson LM, Gibson J, Binnie VL. Oral cancer prevention and detection in primary dental healthcare. *Prim Dent Care*. 2002; 9(4): 119-23.

Drobnjak M, Melamed J, Taneja S, Melzer K, Wieczorek R, Levinson B, Zeleniuch-Jacquotte A, Polsky D, Ferrara J, Perez-Soler R, Cordon-Cardo C, Pagano M, Osman I. Altered expression of p27 and Skp2 proteins in prostate cancer of African-American patients. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(7): 2613-9.

Elias R, Oliva Filho A, Barino B, Andrade T. Câncer bucal. *JBC J Bras Clin Odontolo Integr*. 2002; 6(31): 25-8.

Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc*. 2002; 68(10): 617-21.

Everson JW. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. *J Oral Pathol*. 1981; 10(3): 129-46.

Field JK, Spandidos DA, Yiagnisis M, Gosney JR, Papadimitriou K, Stell PM. C-erbB-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*. 1992; 12(3): 613-9.

- Fillies T, Woltering M, Brandt B, Van Diest JP, Werkmeister R, Joos U, Buerger H. Cell cycle regulating proteins p21 and p27 in prognosis of oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep.* 2007; 17(2): 355-9.
- Florenes VA, Maelandsmo GM, Kerbel RS, Singerland JM, Nesland JM, Holm H. Protein expression of cell cycle inhibitor p27<sup>kip1</sup> in malignant melanoma. *Am J Pathol.* 1998; 153(1): 305-12.
- Forastiere A, Koch W, Trotti A, SIDRNSKY D. Head and Neck Cancer. *The New England Journal of Medicine.* 2001; 345 (26): 1890-900.
- Fujieda S, Inuzuka M, Tanaka N, Sugana H, Fan GK, Ito T, Sugiomoto C, Saito H. Expression of p27 is associated with Bax expression and spontaneous apoptosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 1999; 84(3): 315-20.
- Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, El Nagggar A, Westra W, Califano J, Johnson N, MacDonald DG. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *Pathology & Genetics Head and Neck Tumours.* Lyon: IARC Press, 2005. p.177-179.
- Ganiatsas S, Dow R, Thompson A, Schulman B, Germanin D. A splice variant of Skp2 is retained in the cytoplasm and fails to direct cyclin D1 ubiquitination in the uterine cancer cell line SK-UT. *Oncogene.* 2001; 20(28): 3641-50.
- Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol.* 1991; 138(4): 867-73.
- Gonzalez-Moles MA, Caballero R, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Bravo I. Prognosis value of the expression of Ki-67 for squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Acta Stomatol Belg.* 1996; 93(4): 159-65.
- Goto M, Tsukamoto T, Inada KI, Mizoshita T, Ogawa T, Terada A, Hyodo I, Shimozato K, Fasegawa Y, Tatematsu M. Loss of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression in invasive fronts of oral tongue squamous cell carcinomas is correlated with tumor progression and poor prognosis. *Oncol Rep.* 2005, 14(4): 837-46.
- Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, Krek W. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(9): 5043-8.
- Guerciolini R. Mode of action of Orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1997; 21(Suppl 3): S12-23.
- Guo CB, Cui NB, Yu GY, Liu DX, Meng SC, Song Q. Effects of cerulenin on the endogenous fatty acid synthetic activity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61(8): 909-12.
- Hannun YA, Obeid LM. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipide kind. *J Biol Chem.* 2002; 277(29): 25847-50.

- Heiligtag SJ, Bredehorst R, David KA. Key role of mitochondria in cerulenin-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002; 9(9): 1017-25.
- 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.
- Innocenzi D, Alo PL, Balzani A, Sebastián V, Silipo V, La Torre G, Ricciardi G, Bosman C, Calvieri S. Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol.* 2003; 30(1): 23-8.
- Ito R, Yasui W, Ogawa Y, Toyosawa S, Tahara E, Ijuhin N. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in oral malignant tumors. *Pathobiology.* 1999; 67(4): 169-73.
- Ito T, Mitui H, Udaka N, Hayashi H, Okudela K, Kanisawa M, Kitamura H. Ki-67 (MIB-5) immunostaining of mouse lung tumors induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Histochem Cell Biol.* 1998; 110(6): 589-93.
- Jayakumar A, Tai M, Huang W, Al-Fell W, HSU M, Abu-Elheiga L, Chirala SS, Wakil, SJ. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(19): 8695-9.
- Kanojia D, Vaidya MM. 4-nitroquinoline 1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2006; 42(7): 655-67.
- Katner AL, Hoang QB, Gootam P, Jaruga E, Ma Q, Gnarra J, Rayford W. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells by a recombinant adenovirus expressing p27(Kip1). *Prostate.* 2002; 53(1): 77-87.
- Kearsley JH, Furlong KL, Cooke RA, Waters MJ. An immunohistochemical assessment of cellular proliferation markers in head and neck squamous cell cancers. *Br J Cancer.* 1990; 61(6): 812-7.
- Kim MM, Califano JA. Molecular pathology of head-and-neck cancer. *Int J. Cancer.* 2004; 112(4): 545-53.
- Kitajima S, Kudo Y, Ogawa I, Bashir T, Kitagawa M, Miyayachi M, Pagano M Takata T. Role of Cks1 overexpression in oral squamous cell carcinomas: cooperation with Skp2 in promoting p27 degradation. *Am J Pathol.* 2004; 165(6): 2147-55.
- Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW. A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem.* 2004; 279(29): 30540-5.
- Kolibaba KS; Druker BJ. Protein tyrosine kinases and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1333(3): F217-48.
- Kridel SJ, Axelrod F, Rosenkrants N, Smith W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res.* 2004; 64(6): 2070-5.

- Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE, Grizzle WE. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck*. 1999; 21(4): 325-9.
- Kudo Y, Kitajima S, Ogaw I, Miyauchi M, Takata T. Down-regulation of Cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2005; 41(2): 105-16.
- Kudo Y, Takata T, Yasui W, Ogawa I, Miyauchi M, Takekoshi T, *et al*. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup> is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1998; 83(12): 2447-55.
- Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(7): 3450-4.
- Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Either SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res*. 2003; 63(1): 132-9.
- Kuo MY, Hsu HY, Kok SH, Kuo RC, Yang H, Hahn LJ, Chiang CP. Prognostic role of p27(Kip1) expression in oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol*. 2002; 38(2): 172-8.
- Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology*. 2002; 40(1): 71-9.
- Kushner J, Bradley G, Jordan RC. Patterns of p53 and Ki-67 protein expression in epithelial dysplasia from the floor of the mouth. *J Pathol*. 1997; 183(4): 418-23.
- Küstner EC, Costa IF, Lopes JL. Oral cancer risk and molecular markers. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2004; 9: 377-84.
- Lacasa D, Le Liepvre X, Ferre P, Dugail I. Progesterone stimulates adipocyte determination and differentiation 1/sterol regulatory element-binding protein 1c gene expression: potential mechanism for the lipogenic effect of progesterone in adipose tissue. *J Biol Chem*. 2001; 276(15): 11512-6.
- Li JN, Gorospe M, Cherst FJ, Kumaravel TS, Evans MK, Han WH, Pizer ES. Pharmacological inhibition of fatty acid synthase activity produces both cytostatic and cytotoxic effects modulated by p53. *Cancer Res*. 2001; 61(4): 1493-9.
- Li T. Expression of p53 protein during 4NQO-induced lingual carcinogenesis in two strains of rats. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2000; 35(2): 126-8
- Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Hotchetokov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarllo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med*. 2002; 8(10): 1153-60.
- Lisztwan J, Marti A, Sutterluty H, Gstaiger M, Wirbelauer C, Krek W. Association of human CUL-1 and ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 with the F-box protein p45(SKP2):

evidence for evolutionary conservation in the subunit composition of the CDC34-SCF pathway. *Embo J*. 1998; 17(2): 368-83.

Liu SC, Suater ER, Clapper ML, Feldman RS, Levin L, Chen SY, Yen TJ, Ross E, Engstrom PF, Klein-Szanto AJP. Markers of cell proliferation in normal epithelia and dysplastic leukoplakias of the oral cavity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998; 7(7): 597-603.

Liu X, He R, Chen W. A rat model of tongue mucosa squamous cell carcinoma induced by oral administration of 4NQO in drinking water. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 1999; 34(6): 354-6.

Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Chevile JC, and Cheithauer BW. p27<sup>kip1</sup>: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancer. *Am J Pathol*. 1999; 154(2): 313-23.

Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup GF, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med*. 1997; 3(2): 231-4.

Lu S, Archer MC. Fatty acid synthase is a potential molecular target for the chemoprevention of breast cancer. *Carcinogenesis*. 2005; 26(1): 153-7.

Marti A, Wirbelauer C, Scheffner M, Krek W. Interaction between ubiquitin-protein ligase SCF<sup>SKP2</sup> and E<sub>2</sub>F-1 underlies the regulation of E<sub>2</sub>F-1 degradation. *Nat Cell Biol*. 1999; 1(1): 14-9

Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004; 432(7015): 298-306.

Medes G, Thomas A, Weinhouse S. Metabolism of neoplastic tissue IV: A study of lipid synthesis in neoplastic tissue slices in vitro. *Cancer Res*. 1953; 13(1): 27-9.

Menendez JA, Vellon L, Lupu R. Antitumoral action of the anti-obesity drug orlistat (Xenical<sup>TM</sup>) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA-3 mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Ann Oncol*. 2005a; 16(8): 1253-67.

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

Menendez JA, Vellon L, Ruth L. Orlistat: From antiobesity drug to anticancer agent in Her-2/neu (erbB2) overexpressing gastrointestinal tumors? *Exp Biol Med*. 2005b; 230(3): 151-4.

Miller CS, Henry RG, Rayens MK. Disparities in risk and survival form oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 95(5): 579-5.

Mineta H, Miura K, Suzuki I, Takebayashi S, Amano H, Araki K, Harada H, Ichimura K, Wennerberg JP, Dictor MR. Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1999; 85(5): 1011-7.

- Nakahara W, Fukuoka F, Sugimura T. Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Gan.* 1957; 48(2):129-37.
- Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K, Hatakeyama S. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J.* 2000; 19(9): 2069-81.
- Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the Wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head Neck.* 1996; 18(5): 441-9.
- Nauta JM, Roodenburg JLN, Nikkels PGJ, Witjes MJH, Vermey A. Comparison of epithelial dysplasia – the 4NQO rat palate model and human oral mucosa. *Int J. Oral Maxillofac. Surg.* 1995; 24(1 Pt 1): 53-8.
- Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, Suzul 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 CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- Niwa S, Ueno S, Shirasu R. Alteration of pRb expression in the development of rat tongue carcinoma induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. *Oral Oncol.* 2001; 37(7): 579–85.
- O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2002; 38(7): 627-40.
- Ogden GR, Macluskey M. An overview of the prevention of oral cancer and diagnostic markers of malignant change: 1. Prevention. *Detal Update.* 2000; 27(2): 95-9.
- Oliver RJ, MacDonald DG. G1 cyclins in oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2001; 30(2): 80-6.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science.* 1995; 269(5224): 682-5.
- Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Iezzi G, Santinelli A. Prevalence of p53, bcl-2 and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60(5): 532-40.
- Patton EE, Willems AR, Sa D, Kuras L, Thomas D, Craing KL, Tyers M. Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev.* 1998; 12(5): 692-705.
- Perea BGM, Bernal JSV, Bustillo RS. Estudio inmunohistoquímico del carcinoma epidermoide de labio. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005; 10(5): 454-61.
- Philipp-Staheli J, Kim KH, Payne SR, Gurley KE, Liggitt D, Longton G and Kemp CJ. Pathway-specific tumor suppression. Reduction of p27 accelerates gastrointestinal tumorigenesis in APC mutant mice but not in Smad3 mutant mice. *Cancer cell.* 2002; 1(4): 355-68.

- Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbürger DC et al. The expression of fatty acid synthase (FAS) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol.* 2000; 31(9): 1068-73.
- Pizer ES, Chrest FJ, Diguseppe JA, Han WF. Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. *Cancer Res.* 1998; 58(20): 4611-5.
- Pizer ES, Thupari J, Han WF, Pinn ML, Chrest FJ, Frehywot GL, Townsend CA, Kuhajda FP. Malonyl-coenzyme 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.
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massagué J, Roberts JM, Koff A. p27 a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- $\beta$  and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 1994; 8(1): 9-22.
- Porter P L, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling, JR, Roberts JM. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat. Med.* 1997; 3(2): 222-5.
- Pulhez DA. Avaliação da expressão imunohistoquímica de *Fatty Acid Synthase (FAS)*, c-erb-b2, p27 e skp2 em carcinomas espinocelulares intrabuciais, de lábio inferior e de pele [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2007.
- Radke S, Pirkmaier A, Germain D. Differential expression of the F-box proteins Skp2 and Skp2B in breast cancer. *Oncogene.* 2005; 24(21): 3448-58.
- Roland NJ, Caslin AW, Bowie GL, Jones AS. Has the cellular proliferation marker Ki-67 any clinical relevance in squamous cell carcinoma of the head and neck? *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1994; 19(1): 13-18.
- Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N, Symmans WF, Hortobagay GN, Pusztai L. Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn.* 2003; 3(5): 573-85.
- Rossi S, Graner E, Febro P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T, Bubley G, Balk S, Loda M. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Molecular Cancer Research.* 2003; 1(10): 707-15.
- Sanderson R, Ironside AD. Squamous cell carcinomas of the head and neck. *BMJ.* 2002; 325(7368): 822-7.
- Sato K, Okazaki Y, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane GY. Expression of beta-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. *Oral Oncology.* 2002; 38(8): 772-8.
- Schrump DS, Cheng GA, Consuli U, Jin X, Roth JA. Inhibition of esophageal cancer proliferation by adenovirally mediated delivery of p16<sup>INK4</sup>. *Cancer Gene Ther.* 1996; 3(6): 357-64.

- Scully C, Felix DH. Oral Medicine – Update for the dental practitioner oral cancer. *Br Dent J*. 2006; 200(1): 13-7.
- Scully C. Oncogenes, tumour suppressors and viruses in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1993; 22(8): 337-47.
- Shapira M, Ben-Izhak O, Linn S, Futerman B, Minkov I, Hershko DD. The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2005; 103(7): 1336-46.
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of 27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*. 2002; 8(10): 1145-52.
- Shintani S, Li C, Mihara M, Hino S, Nakashiro K, Hamakawa H. Skp2 and Jab1 expression are associated with inverse expression of p27(Kip1) and poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oncology*. 2003; 65(4): 355-62.
- Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T, Wong DT. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol*. 2002; 38(3): 235-43.
- Signoretti S, Di Marcotulio L, Richardson A, Ramaswamy S, Isaac B, Rue M, Monti F, Loda M, Pagano M. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *J Clin Invest*. 2002; 110(5): 633-41.
- Signoretti S, Montironi R, Manola J, Altimari A, Tam C, Bublely G, Balk S, Thomas G, Kaplan I, Hlatky L, Hahnfeldt P, Kantoff P, Loda M. Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(23): 1918-25.
- Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA, Kowalski LP, Graner E. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol*. 2004; 40(7): 688-96.
- Sioga A, Economou L, Kaklamanos EG, Antoniadis V, Keramidis G, Manthos A, Antoniadis K. Ultrastructural changes of the palatal mucosa following application of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) in rats subjected to major salivary gland excision. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101(4): 487-98.
- Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol*. 2000; 183(1): 10-7.
- Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Review Prog Lipid Res*. 2003; 42(4): 289-317.
- Suzuki R, Kohno H, Suzui M, Yoshimi N, Tsuda H, Wakabayashi K, Tanaka T. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis*. 2006; 27(3): 619-30.
- Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol*. 2004; 5(1): 27–36.

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

Swinnen JV, Vanderhoydonc F, Elgamal A, Eelen M, Vercaeren I, Joniau S, Van Poppel H, Baert L, Goossens K, Heyns W, Verhoeven G. Selective activation of the fatty acid synthesis pathway in human prostate cancer. *Int J Cancer.* 2000; 88(2): 176-9.

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

Takeda T, Sugihara K, Hirayama Y, Hiramio M, Tanuma JI, Semba I. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. *J Ora Pathol Med.* 2006; 35(6): 369-75.

Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Hirose Y, Wang A, Mori H, Satoh K, Hara A, Ogawa H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of  $\beta$ -carotene. *Cancer Res.* 1994; 54(17): 4653-9.

Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(1 Pt1): 301-13.

Toyoshima H., Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell.* 1994; 78(1): 67-74.

Tsihlias J, Kapusta L, Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med.* 1999; 50: 401-23.

Tsuji T, Sasaki K, Kimura Y, Yamada K, Mori M, Shinozaki F. Measurement of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and its clinical application in oral cancers. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1992; 21(6): 369-72.

Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31(10): 598-604.

Van der Waal I, Axell T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol.* 2002; 38(6): 521-6.

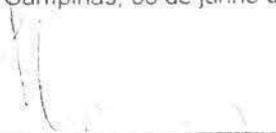
Venkatesan TK, Kurokat C, Caldarelli DD, Panje WR, Hutchinson JC Jr, Chen S, Coon JS. Prognostic significance of p27 expression in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Laryngoscope.* 1999; 109(8): 1329-33.

Viglietto G, Motti ML, Fusco A. Understanding p27(Kip1) deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization. *Cell Cycle.* 2002; 1(6): 394-400.

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-relating genes, proliferating factors, and ras protein product in colorectal adenomas, carcinomas and adjacent nonneoplastic mucosa. *Clin Cancer Res.* 1999; 5(12): 4111-8.

- Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Chikhlikar PR. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. *J Surg Oncol*. 2003; 82(1): 34-50.
- Wang Y, Kuhajda FP, Li JN, Pizer ES, Han WF, Sokoll LJ, Chan DW. Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients. *Cancer Lett*. 2001; 167(1): 99-104.
- Weiss L, Hoffmann GE, Schreiber R, Andres H, Fuchs E, Korber E, Kolb HJ. Fatty acid biosynthesis in man, a pathway of minor importance. Purification, optimal assay conditions and organ distribution of fatty acid synthase. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1986; 367(9): 905-12.
- Werkmeister R, Brandt B, Joos U. Aberrations of erbB-1 and erbB-2 oncogenes in non-dysplastic leukoplakias of the oral cavity. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1999; 37(6): 477-80.
- Werkmeister R, Brandt B, Joos U. Clinical relevance of erbB-1 and erbB-2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol*. 2000; 36(1): 100-5.
- Wilkman TS, Hietanen JH, Malmstrom MJ, Konttinen YT. Immunohistochemical analysis of the oncoprotein c-erb-B2 expression in oral benign and malignant lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998; 27(3): 209-12.
- Wong PNC, Wilson DF. 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis in the rat palate. *J Oral Pathol*. 1983; 12(5): 375-84.
- Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Kiyokawa N, Clayman GL, Katz RL, Hung MC. Strong correlation between c-erb-B-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 1997; 3(1): 3-9.
- Yarden Y. Biology of HER-2 and its importance in breast cancer. *Oncology*. 2001; 61(2 suppl 1): 1-13.
- Zhang Y, Guo C, Yu G. A pilot study of fatty acid metabolism in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 34(1): 78-81.
- Zhang Z, Wang Y, Yao R, Li J, Lubet RA, Yon M. p53 transgenic mice are highly susceptible at 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral cancer. *Mol Cancer Res*. 2006; 4(6): 401-10.
- Zheng WQ, Zheng JM, Ma R, Meng FF, Ni CR. Relationship between levels of Skp2 and p27 in breast carcinomas and possible role of Skp2 as targeted therapy. *Steroids*. 2005; 70(11): 770-4.
- 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.
- Zoeller J, Flentje M, Sinn P, Born IA. Evaluation of AgNOR and Ki-67 antigen as cell kinetic parameters in oral dysplasias and carcinomas. *Anal Cell Pathol*. 1994; 7(1): 77-88.

## ANEXO 1 – Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética na Experimentação Animal.

 UNICAMP	<b>Universidade Estadual de Campinas</b> <b>Instituto de Biologia</b>	
		CEEA-IB-UNICAMP
<b>Comissão de Ética na Experimentação Animal</b> <b>CEEA-IB-UNICAMP</b>		
<b>CERTIFICADO</b>		
<p>Certificamos que o Protocolo nº <b>842-1</b>, sobre "<b>EXPRESSÃO DE FAZ (FATTY ACID SYNTHASE) E c-erb-B2 DURANTE A CARCINOGENESIS INDUZIDA EM CAMUNDONGOS</b>" sob a responsabilidade de <b>Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior / Eduardo Bauml Campagnoli</b> está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de <u>08 de junho de 2005</u>.</p>		
<b>CERTIFICATE</b>		
<p>We certify that the protocol nº <b>842-1</b>, entitled "<b>EXPRESSION OF FAS (FATTY ACID SYNTHASE) AND c-erb-B2 DURING INDUCED CARCINOGENESIS IN MICE</b>", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on <u>June 8, 2005</u>.</p>		
Campinas, 08 de junho de 2005		
		
Profa. Dra. Liana Verinaud Presidente - CEEA/IB/UNICAMP	Fátima Alonso Secretária - CEEA/IB/UNICAMP	
<small>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - INSTITUTO DE BIOLOGIA CIDADE UNIVERSITÁRIA, ZELIPÓLI 962 CEP: 13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL</small>		<small>TELEFONE: 51 35 1788 6050 FAX: 51 35 13 32811121</small>

## ANEXO 2 – Coloração Hematoxilina & Eosina – Protocolo adotado no Laboratório de Patologia Bucal da FOP/Unicamp.

01. Xilol 1 .....	10 minutos
02. Xilol 2 .....	10 minutos
03. Álcool absoluto .....	pôr e tirar
04. Álcool 90% .....	pôr e tirar
05. Álcool 70% .....	pôr e tirar
06. Álcool 50% .....	pôr e tirar
07. Água de torneira .....	duas trocas
08. Passar em água destilada .....	duas trocas
09. Corar na Hematoxilina de Mayer .....	12 minutos
10. Lavar em água de torneira .....	2 trocas
11. Deixar diferenciando com água .....	15 minutos
12. Colocar em álcool 80% .....	02 minutos
13. Colocar na Eosina-Floxina .....	05 minutos
14. Álcool absolutos I .....	pôr e tirar
15. Álcool absolutos II .....	pôr e tirar
16. Álcool absolutos III .....	pôr e tirar
17. Xilol diafanização .....	03 minutos
18. Xilol de montagem .....	03 minutos
19. Montar em bálsamo-do-canadá	

## ANEXO 3 – Valores de $p$ obtidos na análise estatística.

### Análise dos dados com relação ao estudo semiquantitativo

	ErbB-2	FAS	Skp2-B
Teste Kruskal-Wallis	0,0014	0,1026	0,0000
Teste Man Whitney			
N x L	0,0017*	0,3496	0,0007*
N x M	0,0015*	0,2367	0,0004*
N x S	0,0025*	0,0168*	0,0006*
N x C	0,0006*	0,0404*	0,0013*
L x M	0,4576	0,6931	0,4862
L x S	0,7921	0,0820	0,2564
L x C	0,3991	0,1331	0,9790
M x S	0,6209	0,2623	0,7920
M x C	1,0000	0,2914	0,5529
S x C	0,5967	1,0000	0,4274

Nota: (N) epitélio normal, (L) epitélio com displasia leve, (M) epitélio com displasia moderada, (S) epitélio com displasia severa e (C) carcinoma espinocelular.

\* representa diferença estatisticamente significativa ( $\alpha=5\%$ )

### Análise dos dados com relação à intensidade de imunomarcção

	KI-67	ErbB-2	FAS	p27	Skp2-B
Teste Kruskal-Wallis	0,0026	0,4633	0,3684	0,1362	0,1220
Teste Man Whitney					
N x L	0,0026*	-	-	0,4624	0,0455*
N x M	0,0180*	-	-	0,3311	0,0689
N x S	0,0404*	-	-	0,1571	0,0339*
N x C	0,3539	-	-	0,0570	0,0897
L x M	0,7103	0,2983	1,0000	0,6761	0,8073
L x S	0,2918	0,2568	0,7768	0,3166	0,4054
L x C	0,0052*	0,2787	0,3374	0,0917	0,7393
M x S	0,5978	0,7040	0,7768	0,5978	0,3226
M x C	0,0479*	0,8603	0,7734	0,2485	0,9212
S x C	0,1306	0,8383	0,3914	0,5205	0,3075

Nota: (N) epitélio normal, (L) epitélio com displasia leve, (M) epitélio com displasia moderada, (S) epitélio com displasia severa e (C) carcinoma espinocelular.

\* representa diferença estatisticamente significativa ( $\alpha=5\%$ )

### Análise dos dados com relação ao estudo quantitativo

	KI-67	p27
Teste Kruskal-Wallis	0,0096*	<0,0001*
Teste Man Whitney		
N x L	0,0009*	0,3671
N x M	0,0011*	0,1179
N x S	0,0034*	0,0006*
N x C	0,0168*	0,0006*
L x M	0,7806	0,4034
L x S	0,5271	0,0001*
L x C	0,7319	0,0001*
M x S	0,4683	0,0056*
M x C	0,5752	0,0046*
S x C	1,0000	1,0000

Nota: (N) epitélio normal; (L) epitélio com displasia leve; (M) epitélio com displasia moderada, (S) epitélio com displasia severa e (C) carcinoma espinocelular.

\* representa diferença estatisticamente significativa ( $\alpha=5\%$ )

### Comparação entre Grupo 02 (tratado com Orlistat) e o Grupo 03 (não tratado com Orlistat)

	KI-67	ErbB-2	FAS	p27	Skp2-B
Teste Man Whitney					
Semiquantitativa	0,0077*	0,3284	0,1826	0,0209*	0,0019*
Quantitativa	0,0088*	-	-	0,0077*	-
Intensidade	0,0235*	0,4772	0,2135	0,1551	0,0145*

Nota: \* representa diferença estatisticamente significativa ( $\alpha=5\%$ )

### Análise do peso médio dos camundongos no dia do sacrifício.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Grupo 1	-	0,0015*	0,0002*	0,0003*	0,0774	0,0163*
Grupo 2	0,0015*	-	0,6471	0,7978	0,1908	0,4718
Grupo 3	0,0002*	0,6471	-	0,8243	0,0774	0,2391
Grupo 4	0,0003*	0,7978	0,8243	-	0,1047	0,3136
Grupo 5	0,0774	0,1908	0,0774	0,1047	-	0,5561
Grupo 6	0,0163*	0,4718	0,2391	0,3136	0,5561	-

Nota: \* representa diferença estatisticamente significativa ( $\alpha=5\%$ )