

Universidade Estadual do Centro-Oeste

Expressão dos antígenos *HOXC8* e *HOXD10* em carcinoma espinocelular de laringe: análise por imuno-histoquímica

João Frederico Musial

Guarapuava

2015

JOÃO FREDERICO MUSIAL

Expressão dos antígenos *HOXC8* e *HOXD10* em carcinoma espinocelular de laringe: análise por imuno-histoquímica

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Biociências aplicadas a Farmácia, da Universidade Estadual do Centro-Oeste

Orientador: Prof. Dr. David Livingstone Alves Figueiredo

Guarapuava

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por quaisquer meios convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Musial, João Frederico

Expressão dos antígenos *HOXC8* e *HOXD10* em carcinomaespinocelular de laringe: análise por imunohistoquímica.

78p. : il : 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: David Livingstone Alves Figueiredo

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho especialmente aos meus pais **Dina** e **Wanderley**. Se hoje cheguei até aqui, foi por que vocês sempre acreditaram em meu potencial e na minha capacidade. Obrigado por me ensinarem as grandes lições da vida e por nunca deixarem nada me faltar.

Dedico ainda mais ao meu pai, que com muita fé em Deus e com a ajuda da medicina, superou o câncer de laringe. Essa vitória foi o grande estímulo para que eu completasse essa jornada. Sem dúvida, você é o meu grande ídolo e meu referencial.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primariamente a **Deus**, por me atribuir a capacidade de discernir as grandes proezas do mundo e de fazer das minhas capacidades o seu instrumento.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. David Livingstone Alves Figueiredo**, pela grande oportunidade desde a primeira palestra da UNICENTRO, quando o conheci ainda durante a graduação. Mesmo sendo seu primeiro orientando, não lhe faltou destreza e esforço para me ensinar e ajudar nos momentos que precisei. Minha admiração e gratidão!

À minha amada família, meu irmão **Wanderley Junior** e minha cunhada **Aline**. A minha querida irmã **Fernanda** e meu cunhado **Júlio**, que sempre me acolheram nos fins de semanas em São Paulo e também a minha linda sobrinha **Júlia**, sem dúvida um dos momentos mais felizes nesse percurso foi ver você nascer. Agradeço também ao meu tio **Valdeci** e minha prima **Laísa**, pelas caronas e apoio. Por final a minha vó **Elisa Walli**, mesmo não estando mais entre nós, sei que torceu muito mim.

Ao meu grande amigo **Vitor Giorno**, que se mostrou sempre fiel, parceiro e incentivador. Você, com toda certeza, foi um dos protagonistas dessa luta.

A **Anne Karine**, que enquanto estivemos juntos sempre foi uma grande companheira que sempre me incentivou e me ajudou muito, assim como a sua amável **Família**. Sou muito grato a você e a vocês.

Ao **Laboratório Góes e colegas**, por suprimir a minha ausência e por me apoiarem nessa jornada quando precisei.

Ao amigo **Murillo**, que sempre me acolheu no pensionato e me ajudou no que precisei, com certeza um foi um grande apoio em Ribeirão Preto

A todos do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, especialmente ao **Prof. Dr. Wilson e a Prof^a. Dr^a Rafaela Bueno**, pela ajuda e ensinamentos.

A secretaria **Dalvinha**, pela ajuda e das conversas harmoniosas e acolhedoras.

Ao **Prof. Dr. Fabiano P. Saggiaro**, pela importante colaboração na seleção dos blocos e leitura das lâminas.

A técnica do laboratório, **Deise Lucia Chesca Simões**, pelo apoio nos experimentos.

A Fundação Araucária e o CNPq, pelo auxílio financeiro e incentivo a pesquisa.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram e colaboraram com a realização deste trabalho

MUITO OBRIGADO!

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Análise estatística
CCND1	Ciclina D1
CCP	Câncer de Cabeça e Pescoço
CEC	Carcinoma de células escamosas
CECL	Carcinoma espinocelular de laringe
DAB	Diaminobenzidina
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
G1 ou BD	Bem diferenciado
G2 ou MD	Moderadamente diferenciado
G3 ou PD	Pouco diferenciado
GX	Diferenciação não atribuída
HCFMRP	Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HPV	<i>Human papiloma virus</i>
IARC	International Agency for Research on Cancer
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
M	Metástase à distância
mRNA	RNA mensageiro
N	Presença de metástase linfonodal
pTNM	Estadiamento patológico
SERTAP/HC	Serviço de Patologia do Hospital de Clinicas de Ribeirão Preto
T	Características tumor primário
UICC	International Union Against Cancer
USP	Universidade de São Paulo
Zero	Ausências de células neoplásicas marcadas
1+	>0 - 25% das células neoplásicas marcadas
2+	>25 - 50% das células neoplásicas marcadas
3+	>50 - 75% das células neoplásicas marcadas
4+	> 75% das células neoplásicas marcadas
%	Percentual
<	Menor que
=	Igual
>	Maior que
®	Marca registrada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência mundial de câncer (ex. Cânceres de pele não melanoma) em milhões para ambos os sexos em 2012 até 2035. Fonte: IARC 2014.....	21
Figura 2. Carcinogênese e pela exposição crônica dos componentes do tabaco. (Adaptado de Kuper et al.,2002)	23
Figura 3. Partes da laringe: Supraglote (azul), Glote (verde) e Subglote (vermelho) (Adaptado de SCHÜNKE et al, 2006).	26
Figura 4. Incidência mundial de câncer de laringe para homens, mulheres e ambos de 2012 a 2035. Fonte: IARC 2014	27
Figura 5. A) Transformações homeóticas em Drosófilas. B) Distribuição conservação das famílias genicas HOM-C (Drosophila) e HOX (Humanos). (Adaptado de GRIER et al., 2005). 31	
Figura 6. Corte histológico de CECL. Observe a infiltração (seta) celular no canto superior direito da imagem (H&E 200X).	41
Figura 7. Controle positivo <i>HOXD10</i> – Marcação Núcleo/Citoplasmática do epitélio da tuba uterina (200X).	50
Figura 8. Controle Positivo <i>HOXC8</i> – Marcação Núcleo/ Citoplasmática do epitélio glandular do Intestino Grosso (200x).	50
Figura 9. Intensidade das marcações do Antígenos <i>HOXD10</i> e <i>HOXC8</i> em CECL. A(Zero/200x), B(1+/400x), C(2+/400x), D(3+/400x) e E (4+/400x). Coloração marrom caracteriza a marcação pelo anticorpo, resultado a precipitação do DAB através da Peroxidase.	52
Figura 10. Função de sobrevida global dos casos selecionados em meses	58
Figura 11. Função de Sobrevida dos agrupamentos significativos. Recidiva e/ou Metástase: Ausente X Presente. Acometimento Linfonodal: N0 X N+. * p(<0,05) significativos. Kaplan-Meier + Log rank.....	59

Figura 12. Função de Sobrevida dos agrupamentos não significativos. Estágio: Inicial (T1+T2) X Avançado (T3+T4); PD x MD x BD. Kaplan-Meier + Log rank.....	60
Figura 13. Função de Sobrevida das imunomarcações Positivas X Negativas para os antígenos <i>HOXC8</i> e <i>HOXD10</i> . Observe o valor de p não significativo. Kaplan-Meier + Log rank.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do Estágio Inicial e Avançado conforme o Estadiamento.....	28
Tabela 2. Estadiamento Patológico (pTNM) dos pacientes selecionados para o estudo.....	39
Tabela 3. Dados dos anticorpos primários.....	42
Tabela 4. Controles Positivos utilizados para cada anticorpo no experimento.	44
Tabela 5. Dados Clínicos dos pacientes com CEC de Laringe.	47
Tabela 6. Percentual de variáveis clinico-patológicas.	48
Tabela 7. Distribuição das expressões de cada antígeno.	49
Tabela 8. Distribuição da extensão da imunomarcação, segundo as proteínas analisadas.....	51
Tabela 9. Distribuição da expressão antigênica do <i>HOXC8</i> , segundo variáveis (Tabagismo, etilismo, estágio, diferenciação celular, linfonodos infiltrados, metástase, recidiva e óbitos) e valores de p do teste exato de Fisher.	54
Tabela 10. Distribuição da expressão antigênica do <i>HOXD10</i> , segundo variáveis (Tabagismo, etilismo, estágio, diferenciação celular, linfonodos infiltrados, metástase, recidiva e óbitos) e valores de p do teste exato de Fisher.	55
Tabela 11. Distribuição da expressão antigênica do <i>HOXD10</i> conforme a intensidade da marcação, segundo variáveis (Recidiva e/ou Metástase, Tabagismo, Etilismo, Acometimento Linfonodal, Estágio, Grau de Diferenciação).....	57

RESUMO

MUSIAL, J. F. **Expressão dos antígenos *HOXC8* e *HOXD10* em carcinoma espinocelular de laringe: análise por imuno-histoquímica.** 2014. 78f. Dissertação Parcial (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste. 2014

INTRODUÇÃO: O câncer é atualmente a segunda maior causa de morte no mundo. O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é o sexto tipo mais comum com cerca de 300 mil mortes por ano. Entre os CCP o carcinoma espinocelular laringe (CECL) é o segundo mais frequente. Apesar dos avanços em laringologia, a sobrevida se mantém estagnada a mais de três décadas. Com base nisso os pesquisadores procuram marcadores que possam servir como fatores prognósticos. **OBJETIVOS:** Analisar a expressão dos antígenos *HOXD10* e *HOXC8* em CECL e correlacioná-los com características clínico-patológicas e de sobrevida. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Foram analisados 32 pacientes diagnosticados com CECL, sendo 16 iniciais e 16 avançados. Para cada caso foi selecionado o bloco parafinado com o tecido tumoral, sendo os cortes submetidos a reações de imuno-histoquímica com os anticorpos Anti-*HOXC8* e Anti-*HOXD10* (Abcam). **RESULTADOS:** Em um total de 90,6% dos casos foram expressos para *HOXD10* e 9,4% para o *HOXC8*. Não foi significativa as relações clínico-patológicas quando a positividade e intensidade das marcações A correlação da sobrevida em presença X ausência de metástase e/ou recidiva foi significativa ($p=0,016$), como também na presença X ausência de acometimento linfonodal ($p=0,012$). **DISCUSSÃO:** A literatura mostra níveis de expressão variável em diferentes tumores. Nossos resultados demonstram uma alta expressão de *HOXD10* em CECL. Alguns autores relacionam a sua expressão com proliferação, o que reforça o seu papel na carcinogênese. Nossos achados em relação ao *HOXC8* evidenciam níveis de expressão menor que o relatado em outros tumores. Este é o primeiro estudo em relação a análise por IHQ do *HOXC8* em CECL. **CONCLUSÃO:** Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o gene *HOXD10* está altamente expresso em CECL, como também os dados reforçam o impacto da metástase e/ou recidiva e do acometimento linfonodal na sobrevida dos pacientes. Novos estudos são necessários para maior entendimento da expressão desses antígenos em CECL.

Palavras-chave: Câncer de laringe, Genes HOX, Imuno-histoquímica.

MUSIAL, J. F. **Expression of HOXC8 and HOXD10 antigens in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma: immunohistochemical analysis.** 2014. 78p. Partial Dissertation (Master) – Universidade Estadual do Centro-Oeste. 2014

The cancer is currently the second leading cause of death worldwide. The head and neck cancer (HNC) is the sixth most common type with some 300 thousand deaths per year. Among the HNC laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is the second most frequent. Despite advances in laryngology the survival rate remains stationary for more than three decades. Based on this the researchers seek markers that can serve as prognostic factors. **OBJECTIVES:** To analyze the expression of *HOXD10* and HoxC8 antigens in LSCC and correlate with the clinical and pathological characteristics with the survival rates. **CASUISTIC AND METHODS:** We analyzed 32 patients diagnosed with LSCC, 16 initial and 16 in advanced state. For each case we selected the paraffin block with the tumor tissue, and the cuts submitted to immunohistochemical reactions with the Anti-HOXC8 and Anti-HOXD10 antibodies (Abcam). **RESULTS:** A total of 90.6% of the cases were expressed to *HOXD10* and 9.4% for *HOXC8*. No significant clinical-pathological relationship when the intensity of positivity and markings Correlation of survival in the presence X absence of metastasis and / or recurrence was significant ($p = 0.016$) as well as X in the presence absence of lymph node involvement ($p = 0.012$). **DISCUSSION:** In the literature shows variable expression levels in different tumors. Our results showed a high expression of *HOXD10* in CECL. Some authors relate their expression with proliferation, which reinforces its role in carcinogenesis. Our findings regarding the *HOXC8* show expression levels lower than reported in other tumors. This is the first study to analysis by IHC in the HoxC8 CECL. **CONCLUSION:** Based on these results, it is concluded that the HOXD10 gene is highly expressed in CECL, as well as the data reinforce the impact of metastasis and / or recurrence and lymph node involvement in patients' survival. Further studies are needed to better understanding of the expression of these antigens in CECL.

Keywords: larynx cancer, HOX genes, Immunohistochemistry.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	EPIDEMIOLOGIA E O CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	20
1.2	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CANCER DE CABEÇA E PESCOÇO	24
1.3	CÂNCER DE LARINGE	25
1.4	BIOLOGIA MOLECULAR DOS CEC.....	29
1.5	GENES HOMEBOX E A FAMÍLIA HOX	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	PRINCIPAL	34
2.2	ESPECÍFICOS.....	34
3	JUSTIFICATIVA	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	CASUÍSTICA.....	38
4.1.1	Critérios de Inclusão	38
4.1.2	Critérios de Exclusão	38
4.2	SELEÇÃO DOS ANTÍGENOS	40
4.3	ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	40
4.4	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	41
4.4.1	Análise das Reações Imuno-histoquímicas.....	43
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5	RESULTADOS	45
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA	46
5.2	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	48
5.3	EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS	49
5.3.1	Expressão dos antígenos (Positivo X Negativo) e variáveis clínico-patológicas.....	53
5.3.2	Expressão dos antígenos (Zero, 1+, 2+, 3+, 4+) e variáveis clínico-patológicas.....	56

5.4	ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL	58
5.5	ANÁLISE DE SOBREVIDA PELAS VARIÁVEIS	58
6	DISCUSSÃO	62
6.1	EXPRESSÃO DOS ANTIGENOS HOXD10 E HOXC8.....	66
7	CONCLUSÕES.....	71
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA E O CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Desde o início do século XX, em virtude das melhores condições socioeconômicas, houve um aumento considerável da expectativa de vida. Segundo Riley e cols. (2005), esse aumento foi de aproximadamente 28 anos em 1800 para 67 anos em 2001. Sabe-se que o envelhecimento está relacionado a diversas alterações fisiológicas importantes, tais como falhas na vigilância imunológica e mutações genéticas acumuladas por maior exposição a fatores ambientais, que podem contribuir com desenvolvimento de algumas doenças crônicas degenerativas, entre elas o câncer. Atualmente existem mais de 100 tipos de câncer e o aumento da exposição a fatores de risco e agentes carcinogênicos tem sido a maior causa do aumento da sua incidência. (KINOSHITA, 2014).

A incidência global de câncer aumentou de tal maneira que, atualmente, o câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, com cerca de 8 milhões de mortes para ambos os sexos, precedido somente pelas doenças cardiovasculares (FITZMAURICE et al., 2015). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC – *International Agency for Research on Cancer*) a incidência de câncer em 2012 foi de 14 milhões de novos casos, sendo 47% em mulheres e 53% em homens. Para 2035 estima-se que a incidência de câncer aumente em cerca de 42% chegando a 24 milhões de novos casos (Figura 1). No Brasil o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para 2014 aproximadamente 576 mil novos casos, incluindo os de pele não-melanoma (IARC 2014, INCA 2014).

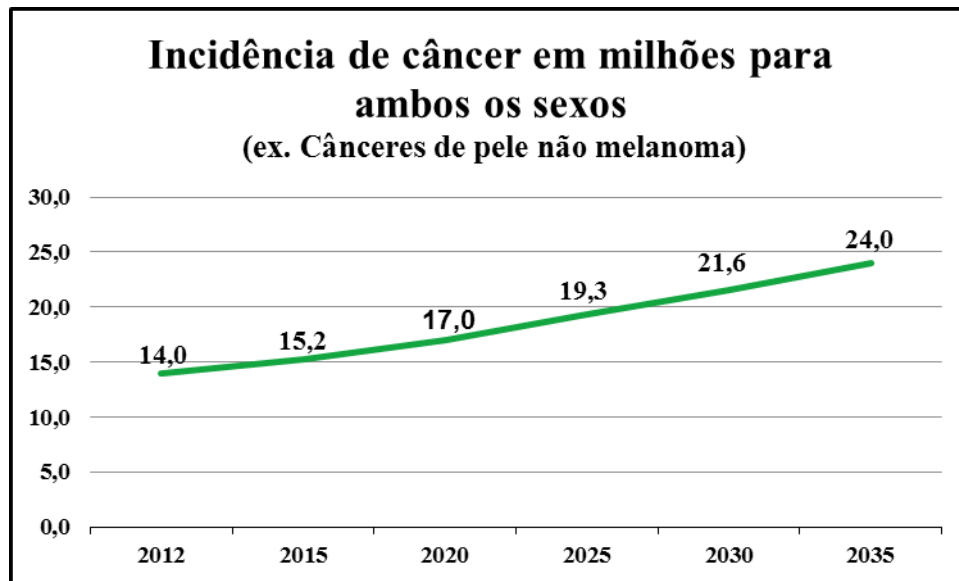


Figura 1. Incidência mundial de câncer (ex. Cânceres de pele não melanoma) em milhões para ambos os sexos em 2012 até 2035. Fonte: IARC 2014

Dentre os diferentes tipos de câncer, o câncer de cabeça e pescoço (CCP) tem relevância em todo mundo, principalmente em países em desenvolvimento. O termo cabeça e pescoço é a denominação de um grupo anatômico representado pela cavidade oral, cavidade nasal, seios paranasais, faringe (naso, oro e hipofaringe) e laringe (supraglótica, glótica e subglótica). O CCP é o sexto tipo mais frequente de câncer no mundo, representado cerca de 5% de todas as neoplasias malignas. Atualmente é responsável por mais de 600 mil casos por ano no mundo todo, e cerca de 300 mil pessoas morrem anualmente por essa neoplasia. O sexo masculino é o mais afetado que o feminino, com uma razão que varia 2:1 a 4:1 dependendo do país ou região (JEMAL, 2011; PTFISER, 2015). Dentre os subtipos, o câncer de cavidade oral é o mais frequente, seguido pelo câncer de laringe. Em homens, dentre todos os cânceres no mundo, o de cavidade oral e laringe ocuparam, respectivamente, a 11ª e 13ª posição no ranking de novos casos em 2014, enquanto no Brasil segundo o INCA os mesmos ocuparam, respectivamente, a 5ª e a 6ª posição entre os mais incidentes, com 11.280 novos casos para cavidade oral e 6.870 para laringe,

em mulheres os índices são 4.010 e 770, respectivamente. Esses índices evidenciam a importância epidemiológica do CPP no Brasil e no mundo (INCA, 2014). O tipo histológico mais frequente é o Carcinoma espinocelular (CEC) ou Carcinoma de células escamosas, representando cerca de 90% dos CCP. (TUNG et al., 2013; KESTING et al., 2009).

Os principais fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço são o tabagismo, o etilismo e as infecções pelo vírus HPV (*Human papilloma virus*). O hábito de fumar está envolvido em uma a cada cinco mortes por câncer no mundo é também o principal fator de risco para o câncer de pulmão (KUPER et. al, 2002; INCA, 2014). O uso de tabaco é responsável por cerca de 42% dos óbitos por câncer de cabeça e pescoço. Existem cerca de 4900 componentes no cigarro e aproximadamente 60 deles são agentes carcinogênicos, tais como nitrosaminas (NIT), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e metais radioativos (R) (HOFFMAN et al.,2001) O mecanismo pelo qual o tabaco induz a carcinogênese (Figura 2), depende de cada um de seus componentes. Em geral os agentes carcinogênicos, pela exposição crônica, causam danos persistente ao DNA da célula o que gera mutações em genes que participam do controle do ciclo celular e apoptose, tais como os genes RAS e p53, e essas mutações inativam tais genes ou desregulam seu controle, permitindo a célula um crescimento descontrolado (KUPER et. al, 2002).

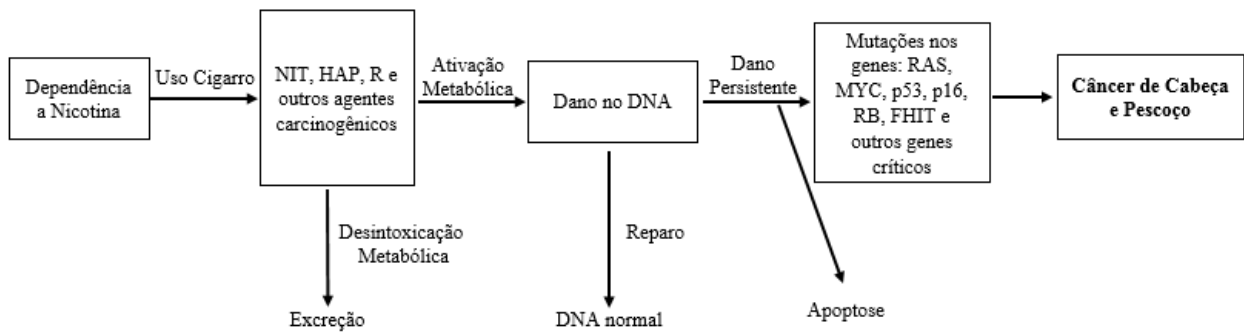


Figura 2. Carcinogênese e pela exposição crônica dos componentes do tabaco. (Adaptado de Kuper et al., 2002)

O etilismo é responsável por 14% dos óbitos das neoplasias de cabeça e pescoço. Um dos mecanismos pelo qual o álcool induz o efeito carcinogênico, se baseia em um aumento da permeabilidade das mucosas expostas, facilitando dessa forma a penetração dos agentes carcinogênicos, tais como o do tabaco (WIGHT, OGDEN, 1998; OGDEN, 2005). Quando em conjunto o hábito de fumar e de beber, o risco de se desenvolver esse tipo de câncer aumenta em 30 vezes. (INCA, 2014)

Mais recentemente a infecção pelo HPV tem mostrado associação com carcinogênese em câncer de cabeça e pescoço, mais especificamente carcinoma de orofaringe (BRAAKHUIS, 2009). Pesquisas atuais têm deixado cada vez mais claro, que casos positivos para HPV têm sido cada vez mais frequentes. Em revisão sistemática publicada em 2005, Kreimer et al identificaram positividade média 23,5% em boca e 35,6% para orofaringe. Essa associação se baseia nas mudanças no comportamento sexual, especialmente pela prática de sexo oral, o que leva a uma maior exposição ao vírus, principalmente na cavidade oral e orofaringe (CASTRO et al., 2004). Por outro lado, a presença do vírus parece ter um prognóstico favorável em comparação a outros fatores de risco (GILLISON et al., 2000).

1.2 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DO CANCER DE CABEÇA E PESCOÇO

A taxa de sobrevida do CCP em 5 anos tem mudado pouco. Nos anos de 1982-1986 a taxa era em torno de 52,7% e entre 2002-2006 aumentou para 65,9%, mesmo com os avanços médicos e tecnológicos. Tratando-se especificamente do câncer de laringe os dados são ainda mais alarmantes, uma vez que a taxa de sobrevida em 5 anos se manteve em 66,8% desde a década de 80 (PULTE et al.,2010).

O estadiamento do CCP é hoje a principal ferramenta para predizer prognóstico e definir terapêutica. A classificação utilizada é a *International Union Against Cancer* (UICC) de 2011, que se define pelos seguintes tópicos: características tumor primário (**T**), presença de metástase linfonodal (**N**) e metástase à distância (**M**) (SOBIN et al., 2011). A presença de metástases à distância ao diagnóstico é inferior a 5% e de metástases linfonodais os índices variam de 20 a 40%. (TAKES et al., 2012; O'SULLIVAN et al, 2003). Estes são os principais fatores que influenciam a sobrevida e consequentemente o prognóstico.

Outro fator que influencia o prognóstico é a presença de margem cirúrgica comprometida, sendo uma das principais causas das recidivas locais (RICKMAN et al., 2008; HARDISSON, 2003).

O tratamento estabelecido para os CCP se define pelo estágio, se inicial é indicado a cirurgia ou radioterapia localizada, se avançado o estabelecido é a ressecção cirúrgica da lesão com radioterapia ou quimioterapia adjuvante. Mesmo com os constantes avanços na área médica os CCP ainda são uma incógnita em muitos aspectos, tais como sua caracterização e o prognóstico ruim, o que torna fundamental a compreensão da sua biologia bem como as possíveis fontes de sua fragilidade. (PATEL et al., 2005).

Apesar da localização anatômica e o estadiamento definirem boa parte do processo do tratamento, a evolução clínica de grande parte dos pacientes com tumores similares é divergente, o que denota a heterogenicidade dos CCP quanto ao seu comportamento biológico e resposta ao tratamento. Na prática essas situações são frequentemente observadas, onde tumores iniciais se comportam de maneira agressiva com metástases e baixa sobrevida e tumores avançados evoluem para cura sem dificuldades aparentes (PATEL et al., 2005).

Os biomarcadores atualmente têm sido um grande alvo de estudos, com a expectativa de que possam contribuir com diagnóstico precoce, melhor definição de prognóstico e indicação terapêutica, incluindo a busca por terapia alvo específica. (TUNG et al., 2013; YANG et al., 2010).

1.3 CÂNCER DE LARINGE

A laringe é um órgão multifuncional, com funções na proteção do trato respiratório como também na produção da voz. Anatomicamente pode ser dividida em três partes, a supraglote, a glote e a subglote (Figura 3). As lesões malignas da laringe comprometem as suas principais funções de acordo com a localização, tamanho e profundidade da invasão. Os principais sinais e sintomas atribuídos a essa patologia incluem disfonia, disfagia, odinofagia, hemoptise, nódulos cervicais, otalgia, comprometimento das vias aéreas com dispneia até insuficiência respiratória. As metástases linfonodais são bastante frequentes, e geralmente são os primeiros sinais clínicos relatados, dessa forma orienta-se que, na presença de um ou mais desses sintomas por mais que 3 semanas, deve-se procurar um especialista (IMBODEN et al., 2014; MARIONE et al., 2006).

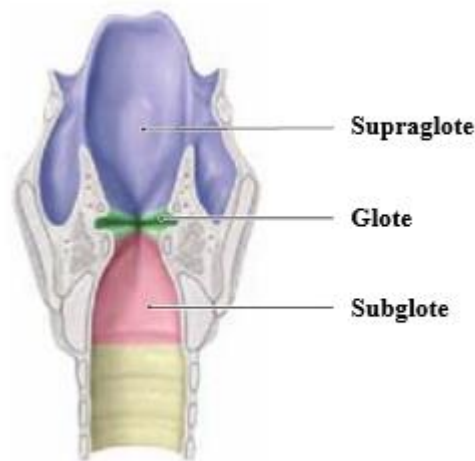


Figura 3.Partes da laringe: Supraglote (azul), Glote (verde) e Subglote (vermelho) (Adaptado de SCHÜNKE et al, 2006).

Em relação aos CCP o câncer de laringe é o segundo mais predominante precedido somente pelo câncer de boca. Em 2035, segundo a IARC, estima-se que os números de mortes por essa neoplasia aumentem em cerca de 45% em relação a 2012 (Figura 4) (ZHANG et al., 2013; IARC, 2014). De todos os tumores malignos dessa região cerca de 95% são classificados como carcinoma espinocelular de laringe (CECL). Quanto a localização anatômica a maior ocorrência é na glote (56%), seguido pela supraglote (31%) e raramente na subglote (1%) (SHAH et al., 1997).

A sua incidência é em geral maior em homens do que em mulheres. O tabagismo e o consumo alcoólico são os fatores associados ao desenvolvimento do câncer de laringe. Em relação ao HPV, a associação com a carcinogênese de laringe não está estabelecida. Alguns pesquisadores atribuem essa característica pelo fato de que a localização anatômica da laringe não ser propícia a infecção pelo vírus, ao contrário da boca e a orofaringe (IARC, 2014; ROSHAN et al., 2014).

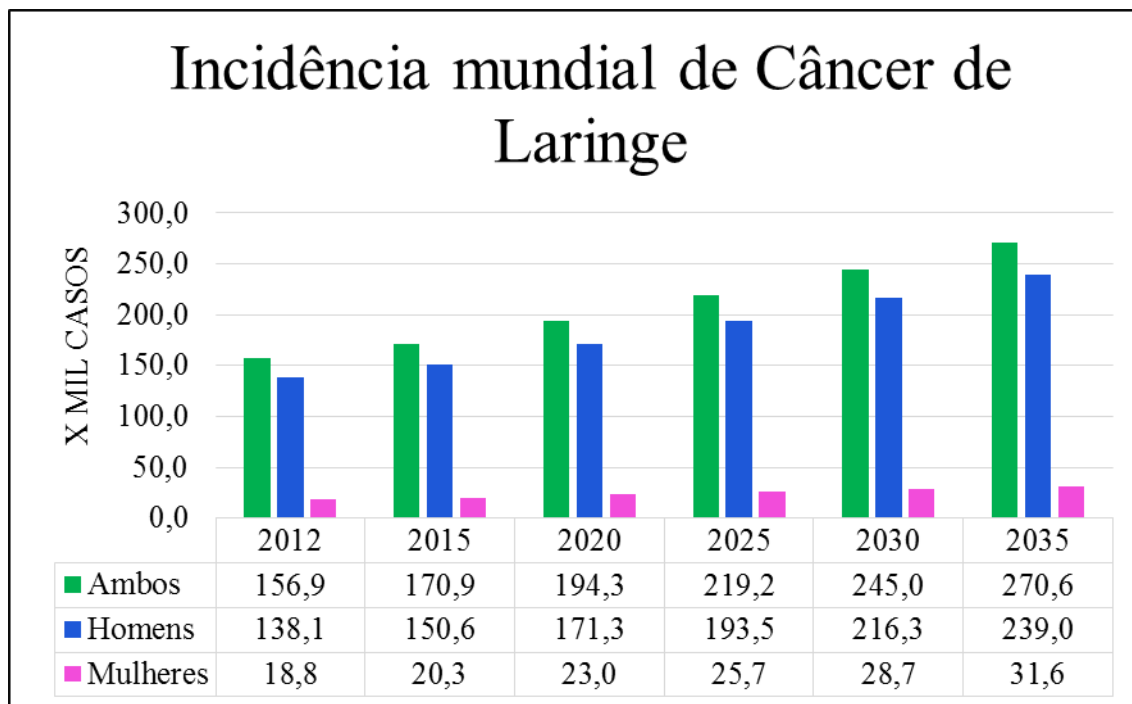


Figura 4. Incidência mundial de câncer de laringe para homens, mulheres e ambos de 2012 a 2035. Fonte: IARC 2014

Parâmetros quanto a localização e estadiamento são de ampla importância para definir o prognóstico da doença. O CECL pode ser dividido em vários estágios: fase inicial (I e II); avançado sem metástase à distância (III e IVA/B) e presença de metástase a distância (IVC), podendo ser correlacionados quanto ao estadiamento, conforme demonstrado na Tabela 1 (SOBIN et al., 2011).

Tabela 1. Classificação do Estágio Inicial e Avançado conforme o Estadiamento

Estádio Global	Estádio	T	N	M
-	Estádio 0	Tis	N0	M0
INICIAL	Estádio I	T1	N0	M0
	Estádio II	T2	N0	M0
		T1	N1	M0
AVANÇADO	Estádio III	T2	N1	M0
		T3	N0, N1	M0
		T1	N2	M0
	Estádio IVA	T2	N2	M0
		T3	N2	M0
		T4a	N0, N1, N2	M0
	Estádio IVB	T4b	Qualquer N	M0
		Qualquer T	N3	M0
		Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N

Fonte: SOBIN et al., 2011. *Carcinoma in situ*(Tis). Tamanho do tumor (T), presença de metástase linfonodal (N) e à distância (M).

Cerca de 15 a 30% dos pacientes apresentam a doença no estágio inicial, e 60 a 80% apresentam a doença em estágio avançado, e esse diagnóstico tardio afeta diretamente o prognóstico na maioria dos casos (IARC, 2014; INCA, 2014; COPONIGRO et al., 2009; JEMAL et al., 2007). Em relação a sobrevida em 5 anos, pacientes em estágio I e II tem uma taxa de 78 a 91%, enquanto que pacientes em estágio III e IV as taxas variam de 42 a 67% (CAREW; SHAH, 1998). Quando se trata do local do tumor, são observados diferentes comportamentos clínicos e risco de metástase linfonodal regional. A supraglote, por exemplo, tem índice muito maior de metástase linfonodais que tumores primários na glote (LEVENDAG et al, 1989; ALVI, 1996).

Todavia o principal critério que define a sobrevida é a presença de metástase linfonodal (N+). Shah e cols (1997) observaram que pacientes com tumores iniciais (T1/T2 N0) e avançados (T3/T4 N0) sem metástase regional a taxa de sobrevida livre da doença em cinco anos gira em torno de 87,5% e 72,1% respectivamente, já em tumores em qualquer estágio, porém com presença de acometimento linfonodal (N+) a taxa de sobrevida é de 46,2%. (SHAH, 1997)

1.4 BIOLOGIA MOLECULAR DOS CEC

A carcinogênese é multifatorial e composta pelo desequilíbrio de inúmeras vias, muitas delas ainda desconhecidas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Como na maioria das neoplasias epiteliais, acredita-se que o desenvolvimento do CEC seja um processo de múltiplas etapas que envolvem a ativação sequencial de oncogênes e a inativação de genes supressores do tumor em uma população clonal de células.

Apesar dos 95% dos CCP serem CEC, há heterogeneidade em suas características e seus mecanismos podem ser diferentes em cada caso podendo determinar o prognóstico. No estudo de Chung et al. (2006), onde foram avaliados a expressão gênica do CEC de cabeça e pescoço, quatro subtipos foram encontrados, com expressões gênicas bastante diversificadas. Alta expressão do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) estava presente no subgrupo com prognóstico ruim. O EGFR tem um papel fundamental na proliferação, diferenciação, sinalização antiapoptótica e nos processos de angiogênese e metástase, características bases para a carcinogênese. Outros autores evidenciam também uma alta expressão de EGFR em CEC, como Hama et al. (2009). O *cetuximab*, um anticorpo monoclonal anti-EGFR têm sido utilizado no tratamento de pacientes com estágios avançados, associado a quimio e radioterapia, e os resultado tem sido positivos, o que enfatiza a importância da busca de biomarcadores que possam contribuir no tratamento desta patologia (HANAHAN; WEINBERG, 2011; BONNER et al., 2006).

Outra principal distinção é da presença de infecção por HPV ou não. Tumores acometidos pelo vírus HPV, por exemplo, são mais comuns em pacientes com menos de 60 anos,

não possuem mutações em oncogenes específicos, tais como o TP53 e o mecanismo é ligado estritamente à infecção do vírus na célula. Estudos têm demonstrado que o tipo 16, quanto infecta, leva a ativação dos oncogenes E6 e E7, que conseqüentemente causa a inativação das proteínas p53 e RB, portanto graves perturbações na regulação do ciclo célula. (LEEMANS et al., 2011; zurHAUSEN et al., 2002).

No CEC HPV-negativo, algumas alterações genéticas têm sido identificadas e definidas a sua progressão desde o epitélio normal. A primeira alteração em geral é a perda das regiões cromossômicas de 3p e 9p21, que como consequência leva a inativação do gene p16, um inibidor da cinase dependente de ciclina, aqui alterações histopatológicas de displasias já podem estar evidentes, em sequência há mutações subsequentes na região 17p13 sobre o gene TP53 o que agravam ainda mais o processo displásico, por fim a supreexpressão do gene CCND1 (Ciclina D1), que ativa constitutivamente a progressão do ciclo celular, podem por consequência iniciar de vez o processo neoplásico. A expressão elevada do CCND1 está relacionada com uma maior taxa de proliferação, invasão e metástase, isto é um prognóstico ruim (ANG et al., 2010; MAO et al., 1996; ROTHENBERG, 2011). Embora esses achados sejam comuns na carcinogênese do CEC, eles não definem por completo o desenvolvimento CEC, muitos outros genes desconhecidos estão envolvidos no processo tumoral e estão sendo descritos pela pesquisa atual.

1.5 GENES HOMEBOX E A FAMÍLIA HOX

Os genes homeobox, são um grupo de genes que são responsáveis por codificar fatores de transcrição que atuam durante o desenvolvimento embrionário em uma ampla quantidade de espécies vertebradas e invertebradas.

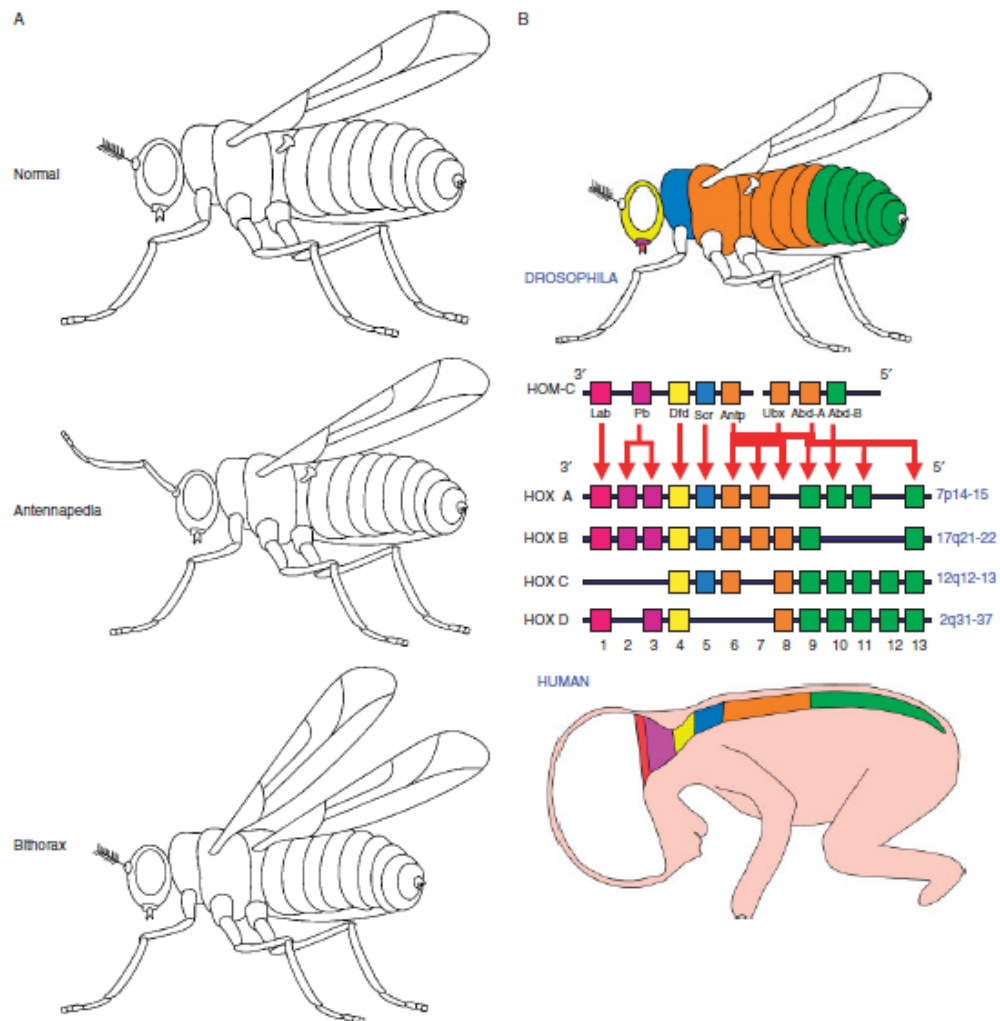


Figura 5.A) Transformações homeóticas em Drosófilas. B) Distribuição conservação das famílias genicas HOM-C (Drosophila) e HOX (Humanos). (Adaptado de GRIER et al., 2005).

Foram descobertos inicialmente em Drosófilas onde mutações em suas bases nucleicas ocasionavam transformações homeóticas, isto é, onde uma estrutura típica de um determinado segmento corporal se desenvolve em outra, um exemplo disso é o caso dos complexos Bithorax (BX-C), onde no lugar dos halteres cresciam asas e do Antennapedia (ANT-C) onde no lugar das antenas cresciam pernas (Figura 5A), diante disso, junto a outros fatores a concepção desses aspectos definiu, de maneira bem clara, que os genes homeobox tem um papel fundamental na padronização do crescimento no eixo corporal, direcionando espacialmente onde cada membro

irá crescer. A principal característica desses genes se deve a presença de uma sequência de DNA específica e altamente conservada durante a evolução denominada de homeodomínio, em geral forma um domínio proteico com cerca de 60 aminoácidos, em geral ele fica localizado na posição terminal ou subterminal do gene, e tem como função principal a ligação com o DNA e conseqüentemente a estimulação ou supressão da transcrição gênica (ABATE-SHEN, 2002; GRIER et al., 2005).

Mais de 200 genes homeobox já foram identificados no genoma humano, e são classificados em famílias de acordo com a sua homologia e similaridade funcional. Dentre as principais famílias destacam-se a família *paired* (PAX), *orthodenticle* (OTX), *muscle segment* (MSX), *distales* (DLX), *caudal* (CDX) e pôr fim a família HOX (STEIN et al.,1996). Nos humanos a família HOX possui 39 membros, com 4 clusters localizados em cromossomos diferentes, são eles: HOXA (loci 7p15.3), HOXB (loci 17p21.3), HOXC (loci 12q13.3) e HOXD (loci 2q31), cada cluster possui de 9 a 11 genes parálogos (Figura 5B). O principal mecanismo pelo qual a expressão dos genes HOX são regulados segue uma regra temporal e espacial, direcionado pela porção 3' em direção a 5', isto é, os genes mais próximos a porção 3' são expressos primariamente e os demais, sentido 5', conforme o embrião se desenvolve. Apesar dos genes HOX serem muito importantes da embriogênese e morfogênese, sua expressão diminui no decorrer da vida, no entanto na carcinogênese há evidencias de que alguns desses genes voltem a ser ativados. (GRIER et al., 2005; STEIN et al.,1996).

Hoje já está bem definido que a carcinogênese e a embriogênese compartilham mecanismos muito semelhantes, tais como a proliferação e diferenciação celular. (SOUNDARARAJAN, 2004). Muitos tumores têm apresentado uma hiperexpressão dos genes HOX, tais como leucemias, câncer de próstata, mama, esofágico e melanomas (TOSIC et al., 2009; MORGAN et al, 2007; WALTREGNY et al, 2002; LI et al, 2011, CHEN et al, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 PRINCIPAL

O Objetivo principal desse estudo foi de avaliar o perfil de expressão dos antígenos *HOXC8* e *HOXD10* em carcinomas espinocelulares de laringe por imuno-histoquímica.

2.2 ESPECÍFICOS

- Correlacionar o perfil de expressão dos antígenos selecionados com os dados clínicos e histopatológicos, tais como idade, tabagismo, etilismo, sobrevida, recidiva e/ou metástase, acometimento linfonodal, graus de diferenciação e óbito.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar de todo avanço na laringologia o câncer de laringe mantém altas taxas de mortalidade, sem melhora nos últimos 40 anos. No Brasil, cerca de 70% dos pacientes são diagnosticados em estágios avançados, o que implica em procedimentos cirúrgicos invasivos com sequelas funcionais, além da piora na sobrevida. A busca por marcadores tumorais que contribuam no diagnóstico precoce e principalmente, que sejam alvos terapêuticos é fundamental para mudar esta realidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Todas as amostras foram colhidas cirurgicamente pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Esse trabalho faz parte do projeto GENOPROT (CNPq – Processo número 559809/2009-3), denominado: Oncogenômica aplicada à terapia de carcinomas de cabeça e pescoço, o mesmo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (Processo HCRP nº 9371/2003).

O período de coleta das amostras foi entre outubro de 2005 até março de 2009. Os critérios de inclusão e exclusão estão listados abaixo:

4.1.1 Critérios de Inclusão

1. Diagnóstico de CECL
2. Neoplasia sem tratamento prévio e com indicação cirúrgica
3. Amostra tecidual representativa para a realização das reações Imuno-histoquímicas (IHQ), com processamento histológico apropriado e em boas condições;

4.1.2 Critérios de Exclusão

1. Dados clínicos indisponíveis ou incompletos (data cirurgia, estadiamento clínico e patológico, radioterapia pós-operatória, recidiva local, segundo tumor primário, óbito)
2. Amostra tecidual mal parafinizada ou degradada;

Foram utilizadas amostras de 32 pacientes com tumores em estado inicial e pacientes com tumores em estado avançado. Para caracterizar o estado de cada paciente foi utilizado o estadiamento patológico (pTNM), descrita pelo *International Union Against Cancer (UICC)* de 2011(SOBIN et al., 2011). A Tabela 2, demonstra cada caso.

Tabela 2. Estadiamento Patológico (pTNM) dos pacientes selecionados para o estudo

Paciente	Estadiamento		Paciente	Estadiamento	
	Inicial			Avançado	
CP5/0186	T2 N0		CP5/0185	T3 N2b	
CP5/0213	T1 N0		CP5/0201	T4 N2c	
CP5/0224	T2 N0		CP5/0205	T1 N2b	
CP5/0247	T2 N0		CP5/0209	T4a N0	
CP5/0287	T1a N0		CP5/0226	T4 N0	
CP5/0331	T2 N0		CP5/0243	T4 N0	
CP5/0333	T2 N0		CP5/0252	T2 N1	
CP5/0336	T2 N0		CP5/0297	T1 N2b	
CP5/0358	T1 N0		CP5/0327	T3 N2c	
CP5/0383	T2 N0		CP5/0332	T4a N0	
CP5/0394	T1 N0		CP5/0335	T4a N1	
CP5/0400	T1 N0		CP5/0344	T4a N0	
			CP5/0361	T2 N2c	
			CP5/0365	T1b N1	
			CP5/0368	T3 N0	
			CP5/0371	T4a N0	
			CP5/0380	T4 N1	
			CP5/0388	T4a N0	
			CP5/0393	T4a N0	
			CP5/0407	T4a N2	

T: extensão do tumor primário (1-4), N: ausência (0) ou presença de metástase em linfonodos regionais (1-3), M: ausência ou presença de metástase à distância (BRASIL, 2014).

4.2 SELEÇÃO DOS ANTÍGENOS

Um dos estudos do projeto GENOPROT foi utilizado RNA das 32 amostras de carcinoma de laringe aqui analisadas mais 16 amostras de epitélio normal de laringe. Neste estudo, fez-se uma análise de Microarranjos (do inglês, *Microarray*), para caracterizar genes com diferença de expressão entre tumor e células normais. A base de sequencias utilizadas na análise foi a plataforma comercial “*Whole Human Genome Oligo Microarray Kit*” (Agilent, G4112F), que continha fragmentos de mais de 41 mil transcritos do genoma humano. A partir da primeira análise, com base na curva de distribuição de densidade e desvio padrão, foram encontrados cerca de 200 genes que apresentavam a maior variância de expressão entre todas as amostras, após essa análise foi realizado uma análise de agrupamento hierárquico não supervisionado das amostras tumorais em relação às amostras de tecido normal, no entanto não foi possível estabelecer uma assinatura de genes mais expressos em tecido tumoral em relação ao tecido normal. A fim de selecionar e estabelecer uma assinatura gênica uma nova análise foi realizada, utilizando os valores de *fold-changed* (\log_2) ≥ 1 e os valores *p-value* $\leq 0,001$. O resultado dessa análise resultou em 30 genes mais expressos no tumor do que em tecido normal. Os genes *HOXD10* e *HOXC8* estão entre os 30 relacionados e foram escolhidos para representar o grupo dos Genes HOX nesse estudo.

4.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Cada bloco selecionado foi anteriormente analisado histologicamente pelo Serviço de Patologia do Hospital de Clinicas de Ribeirão Preto (SERTAP-HC), dois patologistas cirúrgicos

com experiência na área foram responsáveis pelas análises e emissão dos laudos anatomopatológicos. A classificação estabelecida foi conforme as diretrizes do Manual de Padronização de Laudos Anatomopatológicos (BACCHI; ALMEIDA; FRANCO, 2005). A Figura 6 representa a microscopia de um CECL em hematoxilina/eosina.

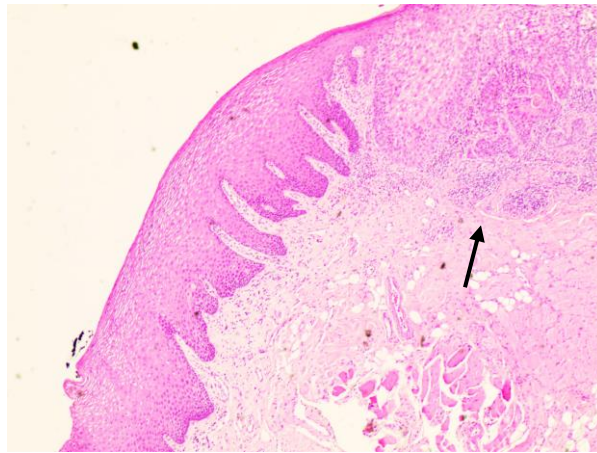


Figura 6. Corte histológico de CECL. Observe a infiltração (seta) celular no canto superior direito da imagem (H&E 200X).

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para cada um dos 32 casos foram obtidos cortes seriados de 4 μ m provenientes de blocos de tecido parafinizado, que posteriormente foram aderidos em lâminas silanizadas carregadas positivamente (STARFROST[®] - Knittel). Cada lâmina foi desparafinizada e hidratada pela imersão em xileno, diferentes graduações etanólicas decrescentes e por fim água destilada em tempos determinados. Para o bloqueio da peroxidase endógena cada lâmina foi imersa em uma solução do kitDHP-125 - Hydrogen Peroxide Blocker[®] (Spring Bioscience) e para o bloqueio de proteínas foi utilizado a solução DBP-125 - Protein Blocker[®] (Spring Bioscience).

Antes da imunomarcação foi realizada a recuperação antigênica pelo método HIER (*Heat Induced Epitope Retrieval*), onde as lâminas são imergidas em uma solução de citrato de sódio 10mM, pH 6,0, a 125  C por 4 minutos e 90  C por 45 minutos em uma câmara de pressão.

A diluição do anticorpo primário foi realizada como recomendada pelo fabricante (Tabela 3), como diluente se utilizado o ADS-125 - AntibodyDiluent  (*Spring Bioscience*).

Tabela 3. Dados dos anticorpos primários

Anticorpo	Diluição	Tampão	Marca
Anti- <i>HOXC8</i> (ab86236)*	1:200	Citrato 10mM, pH 6,0	Abcam
Anti- <i>HOXD10</i> (ab172865)*	1:100	Citrato 10mM, pH 6,0	Abcam

*Ambos são policlonais, produzidos através de soro de afinidade isolada.

Para realizar a imunomarcação das lâminas foram seguidos os seguintes paços em temperatura ambiente:

- Incubar com o anticorpo primário por 120 minutos;
- Lavar 3x com solução tampão (PBS 1X);
- Incubar com o anticorpo complementar por 10 minutos. DCMT-125 - Complementá (*Spring Bioscience*);

(*Spring Bioscience*);

- Lavar 3x com solução tampão (PBS 1X);
- Incubar o anticorpo polimerizado com a enzima peroxidase por 15 minutos. DHRR-125 - HRP Conjugated  (*Spring Bioscience*);

(*Spring Bioscience*);

- Lavar 3x com solução tampão (PBS 1X);
- Revelar a marcação com o substrato diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos. DAB-125 - DAB Substrate System  (*Spring Bioscience*);

(*Spring Bioscience*);

-
-
- Lavar em água corrente;
 - Lavar 2x água destilada;
 - Contracorar com Hematoxilina por 30 segundos;
 - Lavar em água corrente;
 - Pingar 4 gotas de hidróxido de amônio a 10% em etanol 95% na solução;
 - Lavar em água corrente;

Finalmente cada lâmina foi desidratada, pela imersão das mesmas em água, soluções etanólicas crescentes e xileno. Depois de secas foram isoladas com lamínula;

4.4.1 Análise das Reações Imuno-histoquímicas

Para a análise das reações Imuno-histoquímicas utilizou-se um microscópio óptico. O observador foi um patologista com experiência na área e com desconhecimento das informações dos pacientes afim de não haver conflito de análise. Os critérios de classificação estão descritos abaixo:

- Zero: ausências de células neoplásicas marcadas;
- 1+: >0 - 25% das células neoplásicas marcadas;
- 2+: >25 - 50% das células neoplásicas marcadas;
- 3+: >50 - 75% das células neoplásicas marcadas;
- 4+: > 75% das células neoplásicas marcadas;

Foram consideradas positivas as lâminas que tiveram marcações definidas como, 1+, 2+, 3+, 4+ e negativas para zero. Para cada conjunto de reações foi utilizado controles positivos (Tabela 4)

Tabela 4. Controles Positivos utilizados para cada anticorpo no experimento.

Anticorpo	Controles Positivos
Anti-<i>HOXC8</i> (ab86236)	Epitélio digestivo (Cólon)
Anti-<i>HOXD10</i> (ab172865)	Epitélio de Tuba uterina

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação de cada variável, em conformidade com a expressão dos antígenos (Positivo X Negativo), foi utilizado o teste exato de Fisher, bem como o cálculo do *odds ratio* quando significativo. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Para a análise quanto a intensidade da marcação, foi utilizado teste não paramétrico One-way ANOVA seguido pelo teste Kruskal-Wallis para as análises das variáveis com três grupos ou mais, enquanto que dois grupos, o teste utilizado foi o não paramétrico *t-test unpaired* seguindo pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

As funções de sobrevida foram estimadas pelo método Kaplan-Meier e as diferenças entre as curvas pelo teste de Log-rank, tanto para calcular a sobrevida global da amostra como para comparar os seguintes grupos: Inicial X Avançado, Presença de metástase regional (N+) X Ausência de metástase regional (N0), Presença de Recidiva e/ou Metástase X Ausência de Recidiva e/ou Metástase, Grau de Diferenciação G1 x Graus de Diferenciação G2+G3, Anti-*HOXD10* Positivo X Anti-*HOXD10* Negativo e Anti-*HOXC8* Positivo X Anti-*HOXC8* Negativo. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA

Para caracterizar o grupo dos 32 pacientes analisados os mesmos foram subdivididos conforme a Tabela 2.

Em relação a idade média, no grupo dos pacientes com tumores em estadiamento inicial foi de 60 anos e no grupo com estadiamento avançado foi de 62,2 anos, com média geral de 61,1 anos ao diagnóstico. Quanto ao sexo, 31 dos pacientes eram homens e apenas 1 mulher. Em relação aos hábitos de tabagismo e etilismo, todos os pacientes apresentaram história de consumo, sendo o menor tempo de tabagismo de 26 anos e de 20 anos para o etilismo. No momento do diagnóstico 56,25% dos pacientes (n=18) ainda eram fumantes, enquanto 43,75% dos pacientes (n=14) haviam parado de fumar, sendo que o hábito de fumar ao diagnóstico estava mais presente em pacientes com estádios iniciais que avançados (75% x 37,5%). Com relação ao etilismo, apenas um tinha relato de não ter ingerido bebida alcoólica e 53,1% (n=17) ainda eram etilistas ao diagnóstico. No grupo inicial a maioria dos pacientes ainda consumiam bebidas alcoólicas ao diagnóstico representando 62,5% (n=10), já no grupo avançado a maioria já não consumia bebidas alcoólicas com 56,25% (n=9) dos membros. A média de acompanhamento para o grupo inicial foi de 41 meses e 46 meses para o grupo avançado. Um total de 12 (37,5%) pacientes foram a óbito, dentre os quais 8 (25%) foram pela neoplasia. Os resultados agrupados são demonstrados na Tabela 5. Em relação às variáveis clínicas, 25% dos pacientes apresentaram recidivas, 3% metástase e 34% acometimento linfonodal. Nas variáveis patológicas, quando verificamos o grau de diferenciação 18,8% era bem diferenciado (G1), 53,1% moderadamente diferenciado (G2), 18,8% pouco diferenciado (G3) e 12,5% não possuíam avaliação quanto ao grau de diferenciação (GX), enquanto que relativo ao estadiamento T 25,0% eram T1, 28,1% eram T2, 9,4% eram T3 e 37,5% eram T4 (Tabela 6)

Tabela 5. Dados Clínicos dos pacientes com CEC de Laringe.

Parâmetros	Estadiamento		Total
	Inicial (n=16)	Avançado (n=16)	
Idade Média:	60 (40-78)	62,2 (49-83)	61,1
Sexo:			
Masculino	15	16	31
Feminino	1	0	1
Tabagismo (%):			
Sim, ainda fuma	12	6	18
Somente no passado	4	10	14
Nunca Fumou	0	0	0
Etilismo (%)			
Sim, ainda bebe	10	7	17
Somente no passado	5	9	14
Nunca bebeu	1	0	1
Terapia Adjuvante:			
Radioterapia	4	9	13
Quimioterapia	1	1	2
Recidiva	4	4	8
Metástase	1	2	3
Estado paciente:			
Vivo	10	10	20
Óbito	6	6	12
<i>Pela neoplasia</i>	4	4	8
Acompanhamento:			
Meses	41	46	44

Tabela 6. Percentual de variáveis clinico-patológicas.

Variáveis	n	% de tumores
Recidivas		
Sim	8	25
Não	24	75
Metástase		
Sim	3	9,4
Não	29	90,6
Linfonodos		
Sim	11	34,4
Não	21	65,6
GD		
G1	6	18,8
G2	17	53,1
G3	6	18,8
GX	4	12,5
Estadiamento T		
T1	8	25
T2	9	28,1
T3	3	9,4
T4	12	37,5
Estadiamento Clínico		
Inicial (I+II)	12	37,5
Avançado (III+IV)	20	62,5

5.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os 32 espécimes tumorais foram submetidos à IHQ para detecção da expressão das proteínas *HOXC8* e *HOXD10*. Segundo os critérios adotados na metodologia, foi considerada expressão positiva a imunomarcagem maior que 0% das células para os cálculos relativos a Positivo X Negativo.

5.3 EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS

Neste estudo detectamos a expressão do antígeno HOXC8 em 9,4% dos CECL, enquanto para o antígeno *HOXD10* a expressão foi de 90,6%. (Tabela 7) A expressão foi negativa em 87,5% para o *HOXC8* e 6,3% para o *HOXD10*. Para ambos os casos houve uma amostra inconclusiva

Tabela 7.Distribuição das expressões de cada antígeno.

Antígeno	Positivo (%)	Negativo (%)	Inconclusivo (%)
<i>HOXD10</i>	90,6	6,3	3,1
<i>HOXC8</i>	9,4	87,5	3,1

As figuras 7 e 8 ilustram a imunomarcção dos controles e dos anticorpos utilizados.

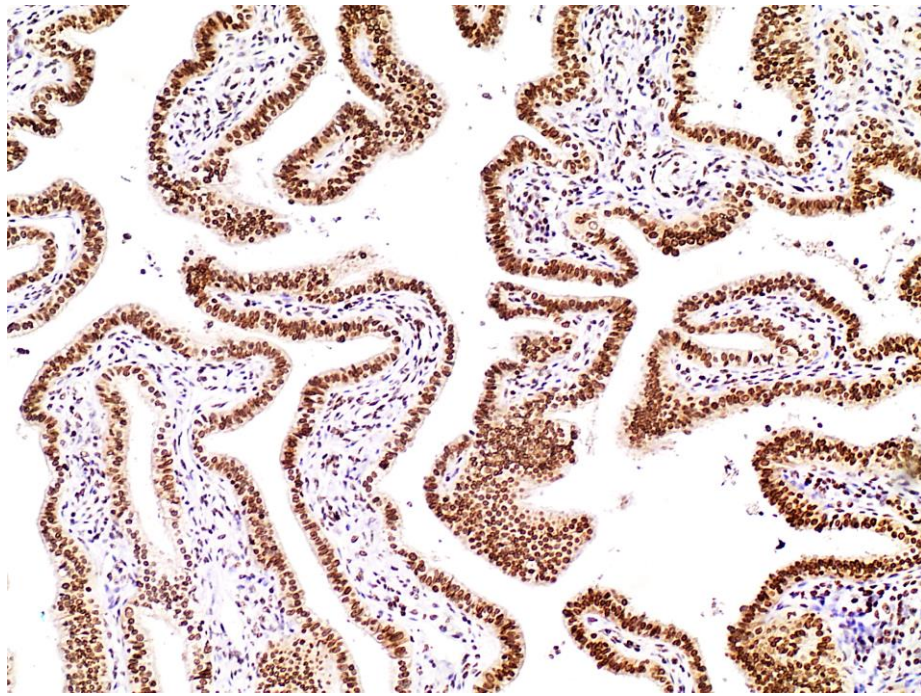


Figura 7. Controle positivo *HOXD10* – Marcação Núcleo/Citoplasmática do epitélio da tuba uterina (200X).

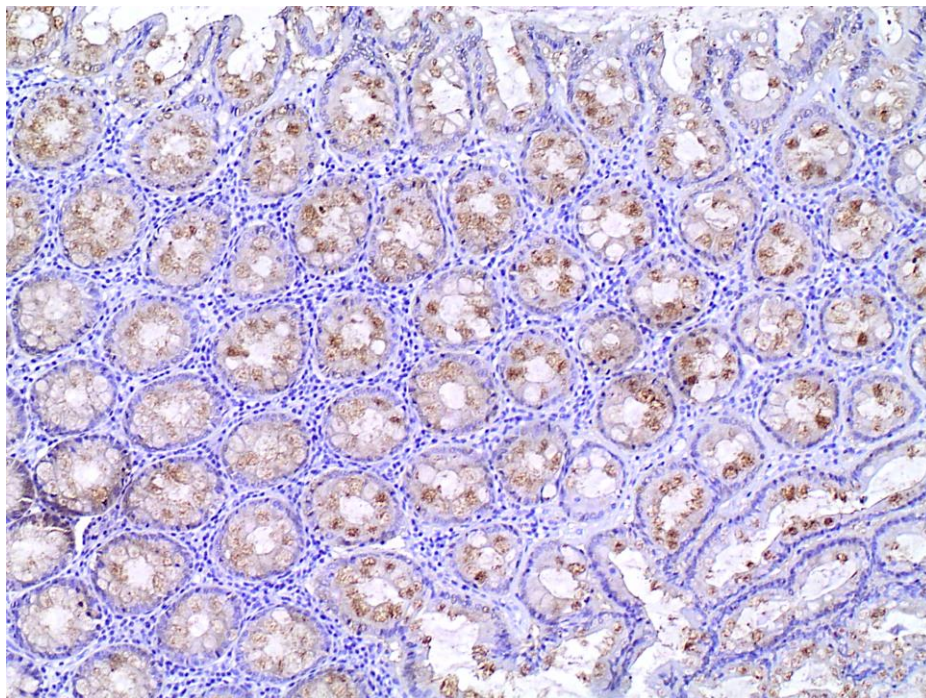


Figura 8. Controle Positivo *HOXC8* – Marcação Núcleo/ Citoplasmática do epitélio glandular do Intestino Grosso (200x).

Observamos, quanto extensão da imunomarcção, os valores apresentados na Tabela 8, observa-se que relativo ao antígeno *HOXC8* 6,3% das reações foram 1+ e 3,1% 2+, enquanto ao antígeno *HOXD10* as proporções foram 15,6% para 1+, 15,6% par 2+, 18,8% para 3+ e 40,6% para 4+. As Figura 9 demonstram as marcações conforme a intensidade.

Tabela 8. Distribuição da extensão da imunomarcção, segundo as proteínas analisadas.

Antígeno	Anticorpo	Extensão da Imunomarcção			
		>0 - 25% (1+)	>25 - 50% (2+)	>50 - 75% (3+)	> 75% (4+)
<i>HOXC8</i>	Anti- <i>HOXC8</i> (ab86236)	2 (6,3%)	0	1 (3,1%)	0
<i>HOXD10</i>	Anti- <i>HOXD10</i> (ab172865)	5 (15,6%)	5 (15,6%)	6 (18,8%)	13 (40,6%)

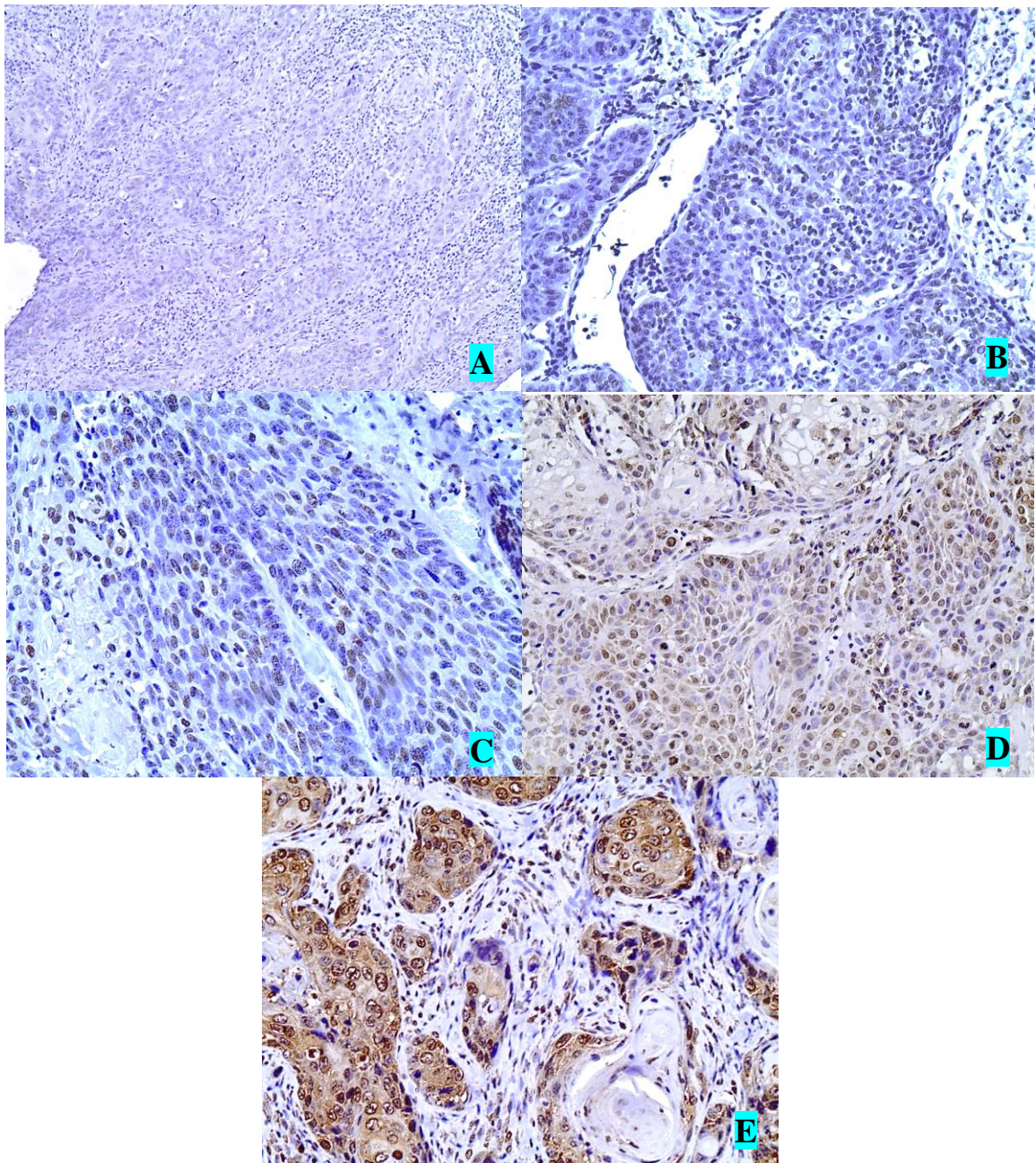


Figura 9. Intensidade das marcações do Antígenos *HOXD10* e *HOXC8* em CECL. A (Zero/200x), B (1+/400x), C (2+/400x), D (3+/400x) e E (4+/400x). Coloração marrom caracteriza a marcação pelo anticorpo, resultado a precipitação do DAB através da Peroxidase.

5.3.1 Expressão dos antígenos (Positivo X Negativo) e variáveis clínico-patológicas

O Estágio, Grau de diferenciação, tabagismo e etilismo foram agrupados para a análise estatística das variáveis, da seguinte forma:

- **Estágio:** Inicial (T1+T2) X Avançado (T3+T4);
- **Grau de diferenciação:** Agrupados Tumores MD e PD x Tumores BD;
- **Tabagismo:** Sim (Presente + Passado) X Não;
- **Alcoolismo:** Sim (Presente + Passado) X Não;

Não houve diferença estatisticamente significativas ao se comparar as variáveis com a expressão dos antígenos *HOXD10* e *HOXC8*. As Tabelas 9 e 10 apresentam de forma detalha os resultados obtidos.

Tabela 9. Distribuição da expressão antigênica do *HOXC8*, segundo variáveis (Tabagismo, etilismo, estágio, diferenciação celular, linfonodos infiltrados, metástase, recidiva e óbitos) e valores de p do teste exato de Fisher.

Variáveis		Antígeno Positivo	Antígeno Negativo	Incon.	Total	AE (p)
Tabagismo	Sim	3	23	1	27	1,00
	<i>Sim, ainda fuma</i>	2	11	1	14	
	<i>Somente no passado</i>	1	12	0	13	
	Nunca fumou	0	0	0	0	
Etilismo	Sim	3	23	1	27	1,00
	<i>Sim, ainda bebe</i>	2	11	1	14	
	<i>Somente no passado</i>	1	12	0	13	
	Nunca bebeu	0	1	0	1	
Estágio	Inicial	0	12	0	12	0,26
	Avançado	3	16	1	20	
Grau de Diferenciação	BD	1	4	1	6	0,47
	MD + PD	2	20	0	22	
Linfonodos	Sim	1	9	1	11	1,00
	Não	2	19	0	21	
Metástase	Sim	0	3	0	3	1,00
	Não	3	25	1	29	
Recidiva	Sim	1	7	0	8	1,00
	Não	2	21	1	24	
Óbitos	Sim	1	7	0	8	1,00
	Não	2	21	1	24	

AE – Análise estatística, Incon. – Inconclusivo.

Tabela 10. Distribuição da expressão antigênica do *HOXD10*, segundo variáveis (Tabagismo, etilismo, estágio, diferenciação celular, linfonodos infiltrados, metástase, recidiva e óbitos) e valores de p do teste exato de Fisher.

Variáveis		Antígeno Positivo	Antígeno Negativo	Incon.	Total	AE (p)
Tabagismo	Sim	24	2	1	27	1,00
	<i>Sim, ainda fuma</i>	12	1	1	14	
	<i>Somente no passado</i>	12	1	0	13	
	Nunca fumou	0	0	0	0	
Etilismo	Sim	24	2	1	27	1,00
	<i>Sim, ainda bebe</i>	11	1	1	13	
	<i>Somente no passado</i>	12	1	0	13	
	Nunca bebeu	1	0	0	1	
Estagio	Inicial	11	1	0	12	1,00
	Avançado	18	1	1	20	
Grau de Diferenciação	BD	5	0	1	6	1,00
	MD + PD	21	1	0	23	
Linfonodos	Sim	20	1	0	21	1,00
	Não	9	1	1	11	
Metástase	Sim	2	1	0	3	0,19
	Não	27	1	1	29	
Recidiva	Sim	7	1	0	8	0,46
	Não	22	1	1	24	
Óbitos pela Neoplasia	Sim	7	1	0	8	0,46
	Não	22	1	1	24	

AE – Análise estatística, Incon. – Inconclusivo.

5.3.2 Expressão dos antígenos (Zero, 1+, 2+, 3+, 4+) e variáveis clínico-patológicas

Não houve diferença estatisticamente significativas ao se comparar as variáveis com a expressão do antígeno *HOXD10* relativo a intensidade da imunomarcção. A Tabela 11 demonstra os valores e o nível de significância entre as variáveis relativas a marcação do *HOXD10*. Não foram realizadas a análises referentes ao antígeno *HOXC8*.

Tabela 11. Distribuição da expressão antigênica do *HOXD10* conforme a intensidade da marcação, segundo variáveis (Recidiva e/ou Metástase, Tabagismo, Etilismo, Acometimento Linfonodal, Estágio, Grau de Diferenciação).

Variáveis	Zero	1+	2+	3+	4+	Total	AE (p)
Recidiva e/ou Metástase							
Sim	2	1	2	2	2	9	0,128
Não	0	4	3	3	11	21	
Tabagismo							
Sim	1	2	2	3	5	13	0,977
No Passado	1	3	2	1	6	13	
Não	0	0	0	0	0	0	
Alcoolismo							
Sim	1	3	2	2	4	12	0,449
No Passado	1	2	2	1	7	13	
Não	0	0	0	1	0	1	
Linfonodo							
Sim	1	1	3	2	3	10	0,447
Não	1	4	2	4	10	21	
Estágio							
Inicial	1	2	2	2	5	12	0,521
Avançado	1	3	3	4	8	19	
Graus de Diferenciação							
BD (G1)	0	2	0	0	3	5	0,638
MD (G2)	0	3	5	5	5	18	
PD (G3)	1	0	0	1	3	5	
Óbito							
Sim	1	1	3	1	2	8	0,230
Não	1	4	2	5	11	23	

AE – Análise estatística. Valores de p: três membros (One-way ANOVA - Kruskal-Wallis) e dois membros (*t-test* unpaired - Wilcoxon-Mann-Whitney). Nas variáveis tabagismo e etilismo não foi considerado o grupo “Não”.

5.4 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL

Foram aplicados o método de construção das curvas de Kaplan-Meier e o teste de Log rank para a comparação das diferentes curvas. A taxa de sobrevida global em 5 anos para a amostra foi de 67,2%, a Figura 10 ilustra a curva obtida para análise.

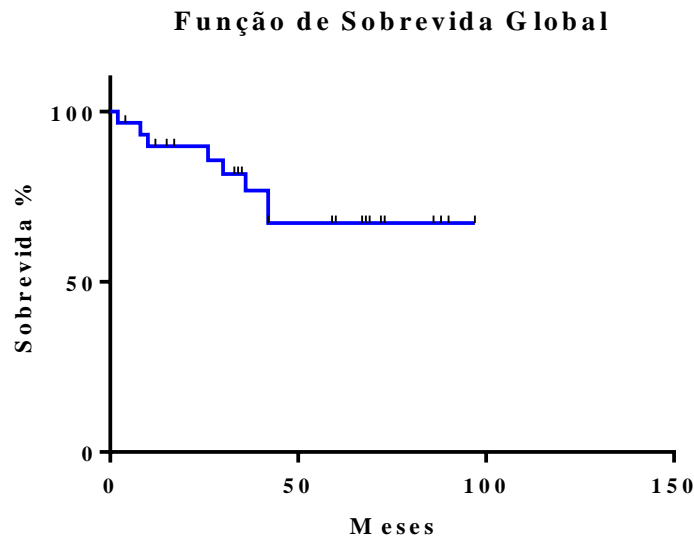


Figura 10. Função de sobrevida global dos casos selecionados em meses

5.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA PELAS VARIÁVEIS

O Estágio, Grau de diferenciação, acometimento linfonodal, presença de recidiva e/ou metástase, foram avaliados da seguinte maneira

- **Estágio:** Inicial (T1+T2) X Avançado (T3+T4);
- **Grau de diferenciação:** PD x MD x BD;
- **Acometimento Linfonodal:** Ausente (N0) X Presente (N+);
- **Recidiva e/ou Metástase:** Ausente (ARM) X Presente (PRM);

Houve diferença significativa para o acometimento linfonodal ($p= 0,012$) e presença de recidiva e/ou metástase ($p=0,016$), para as demais análises o resultado do teste Log rank não demonstrou diferença estatística significativa, as Figuras 11, 12 e 13 abaixo ilustram os gráficos das funções de sobrevida de cada grupamento.

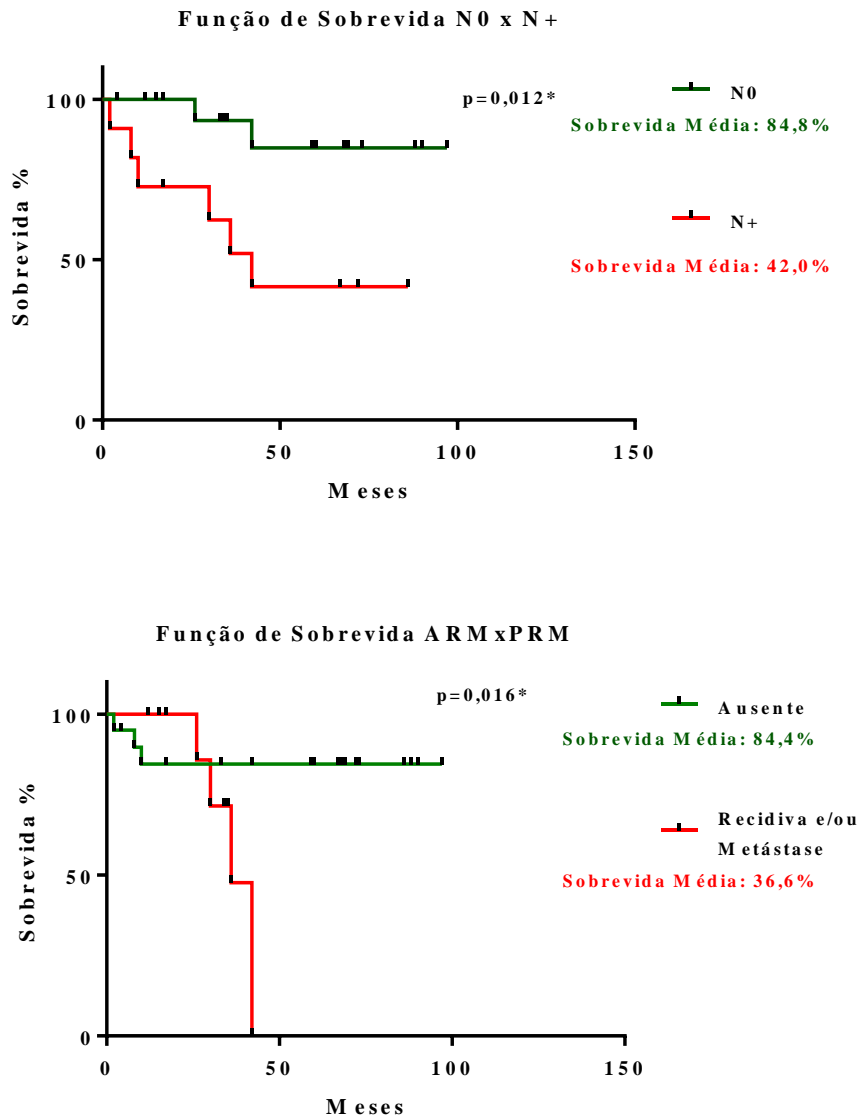


Figura 11. Função de Sobrevida dos agrupamentos significativos. Recidiva e/ou Metástase: Ausente X Presente. Acometimento Linfonodal: N0 X N+. * $p(<0,05)$ significativos. Kaplan-Meier + Log rank.

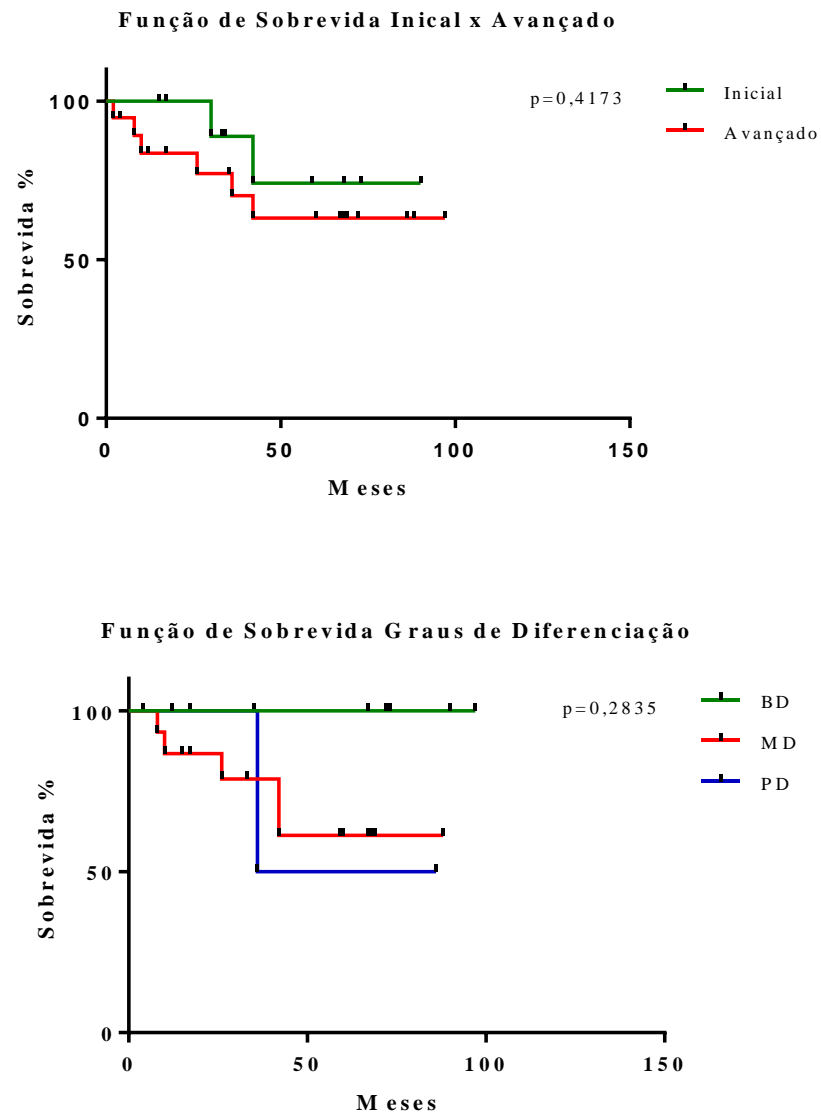


Figura 12. Função de Sobrevida dos agrupamentos não significativos. Estágio: Inicial (I+II) X Avançado (III+IV); PD x MD x BD. Kaplan-Meier + Log rank.

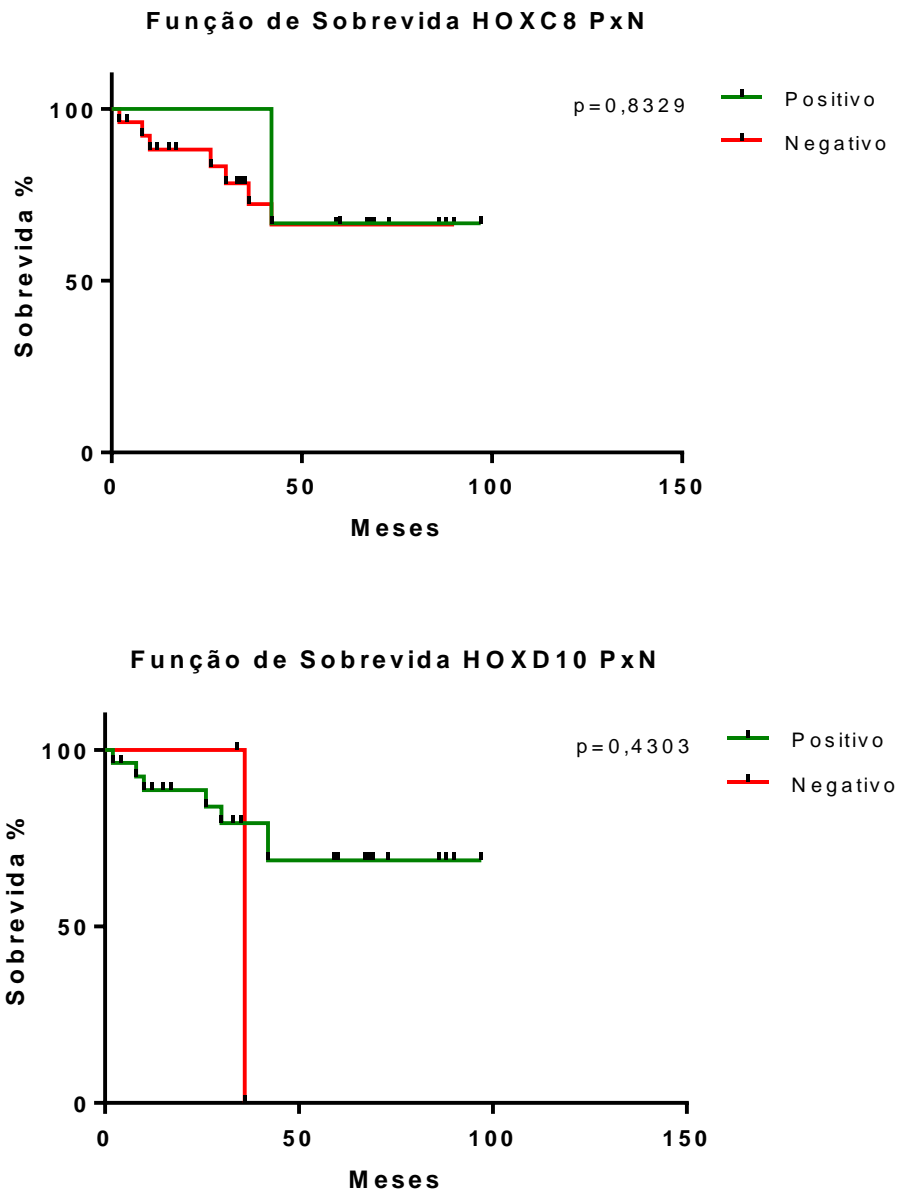


Figura 13. Função de Sobrevida das imunomarcações Positivas X Negativas para os antígenos *HOXC8* e *HOXD10*. Observe o valor de p não significativo. Kaplan-Meier + Log rank.

6 DISCUSSÃO

Em relação aos CCP o câncer de laringe é o segundo mais predominante, precedido somente pelo câncer de boca. Cerca de 95% são classificados como CECL (LEEMANS et al, 2011; SZCZEPANSKI et al., 2007). A sua incidência é maior em homens com mais de 40 anos, sendo aproximadamente 1 caso feminino para cada 8 casos masculinos (IARC,2014). Em nossa amostra obtivemos 1 caso feminino. A faixa etária média encontrada em nosso estudo foi de 60 anos, e está em conformidade com a literatura (COLO et al., 2011; BELBIN et al., 2002).

Todos os pacientes analisados em nosso estudo fizeram ou fazem uso do tabaco, isto é, 100% dos casos foram expostos em algum momento a esse fator de risco. A importância do tabaco como fator de risco se baseia no fato, de atualmente existirem mais de 1 bilhão de fumantes em todo mundo e que o hábito de fumar está relacionado com um a cada cinco casos de câncer. A associação do tabaco com os cânceres de cabeça e pescoço, foi avaliada por Hoffman et al. (2001) e seus dados concluíram que isoladamente o tabaco é responsável por 42% dos óbitos por essa neoplasia. Em relação ao etilismo, apenas um dos pacientes relatou nunca ter bebido (3,1%), já os demais relataram consumir ou ter consumido bebida alcoólica por pelo menos 20 anos. Na literatura estudos demonstram que o tabagismo isoladamente é responsável por 70% dos CECL, quando em conjunto com o etilismo a representação é de 89% (MENACH et al., 2012; HASHIBE et al., 2009), dado também evidenciado em nosso estudo, onde encontramos a associação de etilismo e tabagismo em 96,7% dos casos. O sinergismo entre o hábito de fumar e consumir bebida alcoólica aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço em 30 vezes, quando comparado ao tabagismo isoladamente (INCA, 2014).

A sobrevida global da amostra foi de 67,2%, sendo próximo do relatado em alguns estudos na literatura (SIEGEL et al., 2015; PULTE et al., 2010; HOFFMAN et al., 200). A taxa de sobrevida em 5 anos do câncer em geral tem aumentado cerca de 19% nos últimos anos desde a década de 70 até meados de 2010, justificado especialmente pelos avanços cirúrgicos e

terapêuticos (SIEGEL et al. 2015). Ao analisamos isoladamente o câncer de laringe, os dados têm sido preocupantes, pois as taxas de sobrevida têm diminuído com o passar dos anos. Em 1970 a sobrevida estimada era de 66%, e atualmente a média é de 63% ($p < 0,05$) (SIEGEL et al. 2015). Esses dados demonstram que o prognóstico relativo ao câncer de laringe tem piorado, o que enfatiza a importância de se buscar melhores fatores que possam prever o prognóstico e definir terapêutica.

Ao avaliar a distribuição do grau de diferenciação entre os casos, 18,8% era bem diferenciado (G1), 53,1% moderadamente diferenciado (G2), 18,8% pouco diferenciado (G3) e 12,5% não possuíam avaliação quanto ao grau de diferenciação (GX). Estudos tem relatado percentuais maiores para tumores bem e moderadamente diferenciados, como o Papadas et al. (2010), que em uma análise de 133 casos de CECL, observou que 59,1% eram G2, 23,5% G3 e 17,4%. No estudo Markou et al. (2013), que avaliaram 1088 casos de CECL, os resultados demonstram que 43% eram G1, 42,1% G2 e 11,8% G3. Na literatura vários autores evidenciaram a associação entre grau de diferenciação tumoral e sobrevida em CECL, onde tumores pouco diferenciados afetavam significativamente a sobrevida (PAPADAS et al., 2010; LIU et al., 2012). Quando comparamos a Sobrevida com grau de diferenciação os resultados não foram significativos. Isto pode ser explicado pelo número pequeno da amostra.

Quanto ao estadiamento T 25,0% eram T1, 28,1% eram T2, 9,4% eram T3 e 37,5% eram T4, em relação ao estadiamento clínico (EC) 37,5% eram estágio I e II e 62,5% III e IV. Segundo a literatura, 15 a 30% dos pacientes apresentam a doença no estágio inicial, e 60 a 80% apresentam a doença em estágio avançado (IARC, 2014; INCA, 2014; COPONIGRO et al., 2009; JEMAL et al., 2007). Estudos tem demonstrado que a proporção de tumores avançados tem aumentado desde a década de 80. Segundo Brouha et al. (2003) em um estudo com 4693 pacientes com CCP, a proporção de tumores T4 entre 1980-1982 era de 10,6% e entre 1998-2000

25,2%. Quanto ao câncer de laringe os autores descrevem que entre 1980-82 os tumores T4 representavam 9,8% e entre 1998-2000 14,0%. YU et al. (2012) analisaram 167 pacientes com CECL, e seus dados demonstraram que o impacto do estadiamento T no tumor é bastante significativo ($p = <0,001$), em tumores Tis/T1 a sobrevida em 2 anos foi de 61,3%, enquanto que de tumores T3 e T4 foram 8,8% e 3,8% respectivamente. Esses dados reforçam a importância do diagnóstico precoce, bem como o impacto do estadiamento no prognóstico do paciente.

Afim de avaliar as curvas de sobrevida, os casos foram agrupados os estágios em Iniciais (I e II) e avançado (III e IV), entretanto não encontramos diferença significativa.

Em relação ao estadiamento N, 65,6 % dos pacientes não apresentaram acometimento dos linfonodos, enquanto que 34,4% demonstraram presença de metástase regional, independente do coeficiente (N+). Estudos têm encontrado relações semelhantes, como o de YU et al. (2012), em que na análise de 167 pacientes com CECL, cerca de 40% apresentaram algum nível de metástase regional. Quanto ao prognóstico, em nosso estudo, a taxa de sobrevida em 5 anos para pacientes com presença de metástase regional foi de 42,0%, enquanto que nos pacientes sem metástase regional a sobrevida foi de 84,8%, sendo estatisticamente significante ($p = 0,012$). Shah et al. (1997), assim como em nosso trabalho, constataram que pacientes com acometimento linfonodal (N+) apresentavam taxa de sobrevida de 46,2%, enquanto na ausência a sobrevida era de 87,5% para tumores iniciais (T1/T2 N0) e 72,1% para tumores avançados (T3/T4 N0). Esses dados confirmam os relatos da literatura e enfatizam de maneira clara o impacto que a metástase regional impõe na sobrevida do paciente, reforçando a necessidade de métodos diagnósticos, incluindo biomarcadores, que possibilitem diagnóstico precoce e predição de metástase regional.

Em nosso trabalho 34,4% dos pacientes apresentaram recidiva e/ou metástase à distância durante o acompanhamento. Em relação ao CEC de cabeça e pescoço, cerca de 5% dos pacientes apresentam metástase a distância ao diagnóstico, enquanto que no decorrer da doença os índices

variam de 10 a 40% (TAKES et al., 2012). Ao comparar a sobrevida, constatamos que, na presença de recidiva local e/ou metástase à distância, a taxa sobrevida em 5 anos foi de 36,6% e na ausência desses fatores 84,4%, sendo a diferença entre as curvas, estatisticamente significativa ($p= 0,016$). Na literatura essa relação é bem constatada, onde a presença de metástase, a taxa de sobrevida é calculada em 35%. (SIEGEL, 2015). O conhecimento da evolução clonal do CECL e da aquisição de características biológicas que lhe permitem metastizar é fundamental para identificar marcadores que possibilitem a indicação terapêutica precoce e efetiva nestes casos de comportamento agressivo.

6.1 EXPRESSÃO DOS ANTIGENOS HOXD10 E HOXC8

A literatura tem enfatizado nas últimas décadas a semelhança do câncer com a embriogênese. Desde a formulação da “teoria trofoblástica do câncer”, muitas semelhanças têm sido descritas entre células germinativas e câncer, sendo um dos achados mais importantes nessa relação os antígenos *Câncer-testis*. Esse grupo de proteínas é restrito a embriogênese e não se expressam em outras células, a não ser germinativas; no entanto, estudos têm identificado sua expressão em muitos tipos tumorais, incluindo CECL (FIGUEIREDO et al., 2011) o que corrobora e aproxima os mecanismos do câncer com a gametogênese. Entre os mecanismos mais semelhantes podemos destacar a proliferação, a angiogênese, a invasão e a evasão ao sistema imune. (HANAHAN, 2011; SOUNDARARAJAN, 2004; SIMPSON et al, 2005). (SIMPSON et al, 2005). Além dos *Cancer-testis*, muitos outros antígenos envolvidos a embriogênese têm sido relatados, entre eles podemos destacar os genes da família HOX. As principais funções atribuídas a esses genes são de orientar o crescimento espacial do feto, como também de coordenar os passos de formação dos membros, conferindo-lhe um papel importante nesse contexto fisiológico

(ABATE-SHEN, 2002). Diante disso o estudo dos genes HOX em relação ao câncer é muito importante para compreender um possível mecanismo tumoral, bem como encontrar novos biomarcadores.

Chen et al. (2005), ao analisarem a expressão gênica em carcinomas epidermóides de esôfago e tecido não neoplásico, dos 39 membros da família HOX, 13 demonstravam uma expressão restrita a células malignas, dentre os quais podemos destacar o *HOXC8* e o *HOXD10*,

Waltregny et al. (2002) compararam amostras de mRNA de cânceres de próstata com seus respectivos tecidos normais e o gene *HOXC8* apresentou expressão elevada em 12 das 16 amostras avaliadas. Miller et al. (2000) encontraram também uma diferença de expressão dos genes *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXC6* e *HOXC8* em cânceres de próstata e suas metástases linfonodais quando comparado com o tecido normal, sugerindo um papel importante dos genes *HOX* na progressão da malignidade.

Em relação aos cânceres de cabeça e pescoço há poucos estudos na literatura. Hassan et al. (2006) avaliaram a expressão de membros da família HOX e vários deles tiveram expressão elevada quando comparado com a mucosa normal, são eles: *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXA3*, *HOXA5*, *HOXA9*, *HOXB3*, *HOXB7*, *HOXB9*, *HOXC4*, *HOXC6*, *HOXC8*, *HOXC9*, *HOXC11*, *HOXC13*, *HOXD9*, *HOXD10* e *HOXD11*. Esses achados corroboram com um possível papel dos genes da família HOX na carcinogênese de cabeça e pescoço. Estudos mais recentes têm encontrado genes HOX como o *HOXB9* (DARDA et al., 2015) e *HOXC6* (MOON et al, 2012) supreeexpressos em células de CCECP. Outros genes HOX têm sido avaliados em CCP, Rivera et al. (2014), avaliaram a expressão de *HOXA1* e *HOXB7* em CEC de cavidade oral e orofaringe. Para o *HOXA1* os níveis de expressão encontrados foram 36,2% para cavidade oral e 39,6% para orofaringe, enquanto que *HOXB7* os valores foram 41,9% para cavidade oral e 44,2% para orofaringe.

Especificamente em relação ao câncer de laringe não identificamos, na literatura, estudos diretamente relacionados aos genes HOX;

Em nosso estudo verificamos a expressão por imuno-histoquímica dos antígenos *HOXD10* e *HOXC8* em carcinomas espinocelulares de laringe. Observamos que 90,6% dos casos apresentaram imunomarcção positiva para *HOXD10*, enquanto que para antígeno *HOXC8* apenas 9,4% apresentaram positividade. A literatura não apresenta nenhum estudo que caracterize a expressão do gene *HOXC8* em CECL por IHQ, dessa forma o nosso trabalho é o primeiro a analisar essa relação.

A associação da expressão do gene HOX com características clínicas e patológicas é conflitante da literatura. Em câncer de mama Carrio et al. (2005) observaram que uma menor expressão do *HOXD10* está relacionada diretamente a uma maior proliferação celular, enquanto que no câncer de pulmão, estudado por Plowright et al. (2009), a sua maior expressão está relacionada a uma maior proliferação. Estudos tem demonstrado que em tumores de ovário e mama, o *HOXD10* se comportaria como um supressor tumoral, regulado pelo miR-10b, um microRNA responsável por controlar a sua expressão (BOURGUIGNON et al, 2010; NAKAYAMA et al; 2013) Em câncer de cabeça e pescoço Sharpe et al. (2014) analisaram o antígeno *HOXD10* por *tissue microarray* em 114 amostras, quando positivo a média de sobrevida encontrada foi de 40,7% e na ausência de expressão a sobrevida era de 67,7% (p = 0,001). Também em CCP, Hakami et al. (2014), analisaram 157 amostras de CEC por *tissue microarray* e seus dados demonstraram diferença significativa entre tecidos tumorais e lesões pré-malignas. Os autores constataram, por análises funcionais em linhagem celulares específicas, que o gene *HOXD10* está relacionado com proliferação e migração.

Em relação ao *HOXC8* Du et al (2014) relataram associação da hiperexpressão por qPCR com fatores de pior prognóstico. Em outros tumores como o de colo de útero (ALAMI et al, 1990), próstata (WALTREGNY et al.) e mama (LI et al., 2011), estudos encontraram a hiperexpressão do gene *HOXC8* relacionado com características mais agressivas e metastáticas.

O Grupo de pesquisa GENOPROT tem feitos estudos com os genes HOX relativos a câncer de cabeça e pescoço. No trabalho de Bueno (2014), a expressão dos genes HOX foram analisadas em CECL comparado com as respectivas margens cirúrgicas não tumorais, por *microarray* e qPCR. Os achados demonstraram vários genes HOX altamente expressos nos tumores, os quais podemos destacar o *HOXC8* e o *HOXD10*, no entanto suas análises não demonstraram diferenças significativas entre as variáveis clinico-patológicas.

Além dos ensaios de expressão, análises funcionais de silenciamento genético, via siRNA, foram realizadas em linhagens celulares de cabeça e pescoço FADU e UMSCC para os genes *HOXC8*, *HOXD10* e *HOXD11*. Os resultados demonstraram que ambos quando silenciados isoladamente diminuíam significativamente a proliferação celular das linhagens, reforçando o papel desses genes na carcinogênese. Além da relação com o potencial clonogênico, o silenciamento do gene *HOXC8* levou a uma menor viabilidade na indução do apoptose nas linhagens estudadas, reforçando a associação com a morte celular programada.

Em nosso estudo não observamos associação da expressão dos genes *HOXD10* e *HOXC8* com as variáveis clínicas e patológicas analisadas (Recidiva e/ou Metástase, Tabagismo, Etilismo, Acometimento Linfonodal, Estágio, Grau de Diferenciação). Novos estudos em câncer de laringe com um número maior de amostra são necessários para melhor correlação da expressão com características clínicas e patológicas.

Mesmo com todo avanço adquirido nos últimos anos em relação ao conhecimento da biologia molecular câncer, não há dúvidas de que essa patologia é uma doença muito complexa e

pouco compreendida. Independentemente da associação da expressão dos genes HOX com características clínicas e patológicas, sabe-se que tanto o *HOXD10* quanto o *HOXC8* são fatores de transcrição, e os genes regulados por eles devem ser elucidados para compreender ainda mais a progressão tumoral (ABATE-SHEN, 2002).

O tratamento do câncer ainda é muito limitado em alguns aspectos, os anticorpos monoclonais vêm adquirindo cada vez mais importância na clínica oncológica, visto que podem ser desenvolvidos para alvos estritamente específicos, tais como os antígenos demonstrado nesse estudo. Atualmente muitos anticorpos monoclonais terapêuticos já foram desenvolvidos e um grande número estão em desenvolvimento (REICHERT,2007). O aumento da incidência do câncer e sua importância como um problema de saúde pública em todo o mundo enfatiza a necessidade do desenvolvimento de novas terapias.

O câncer de cabeça e pescoço tem maior relevância epidemiológica em países em desenvolvimento como o Brasil, respondendo por altas taxas de morbi-mortalidade. A compreensão da carcinogênese de cabeça e pescoço com estudos mais complexos e, especificamente, do papel dos genes HOX, pode contribuir para a identificação de biomarcadores de prognóstico e potenciais alvos de terapia monoclonal.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo foi investigado a expressão dos antígenos *HOXC8* e *HOXD10*, por imunohistoquímica em tecidos tumorais de 32 pacientes com carcinoma espinocelular de laringe. Conforme os resultados podemos concluir que:

- Houve imunomarcção para o antígeno *HOXD10* em 90,6% nos tecidos analisados enquanto que para antígeno *HOXC8* a imunomarcção ocorreu em 9,4% dos casos marcados;
- Não foram observadas correlação entre as imuno/expressão e os dados clínicos histopatológicos;
- Foi observado correlação inversa da sobrevida em 5 anos com a presença de recidiva e/ou metástase ($p=0,016$) e entre a presença de linfonodos acometidos ($p=0,012$);

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE-SHEN, C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? **Nat Rev Cancer**, p. 777-785, 2002.

ALAMI, Younes et al. HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 257, n. 3, p. 738-745, 1999.

ANG, K K et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **The New England Journal Of Medicine**, v. 363, n. 1, p.24-35, jun. 2010.

BONNER, J A et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **The New England Journal Of Medicine**, v. 354, n. 6, p.567-578, fev. 2006.

BRAAKHUIS, B J; VISSER, O; LEEMANS, C R. Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults. **Oral Oncology**, v. 45, n. 9, p.85-9, set. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2004.

BOURGUIGNON, Lilly YW et al. Hyaluronan-CD44 interaction promotes c-Src-mediated twist signaling, microRNA-10b expression, and RhoA/RhoC up-regulation, leading to Rho-kinase-associated cytoskeleton activation and breast tumor cell invasion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 47, p. 36721-36735, 2010.

BUENO, Rafaela de Barros e Lima. Genes HOX: potenciais candidatos a atuarem na proliferação do carcinoma espinocelular de laringe. 20142 87f. Tese (Doutorado em Genética). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

CAPONIGRO, F.; LONGO, F.; PERRI, F.; IONNA, F. Docetaxel in the management of head and neck cancer. **Anti-Cancer Drugs**, v. 20, p. 639-645, 2009.

CASTRO, T M P G et al. Manifestações orais associada ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais: revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, n. 4, p.546-550, jul. 2004.

CARRIO, Meritxell et al. Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. **Cancer research**, v. 65, n. 16, p. 7177-7185, 2005.

CHUNG, Christine H. et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. **Cancer cell**, v. 5, n. 5, p. 489-500, 2004.

DARDA, Lav et al. The role of HOXB9 and miR-196a in head and neck squamous cell carcinoma. **PloS one**, v. 10, n. 4, 2015.

DONG, X y et al. Plac1 is a tumor-specific antigen capable of eliciting spontaneous antibody responses in human cancer patients. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 9, p.2038-43, maio 2008.

DU, Ya-Bing et al. The survival predictive significance of HOXC6 and HOXC8 in esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Surgical Research**, v. 188, n. 2, p. 442-450, 2014.

-
-
- FIGUEIREDO, David LA et al. High expression of cancer testis antigens MAGE-A, MAGE-C1/CT7, MAGE-C2/CT10, NY-ESO-1, and gage in advanced squamous cell carcinoma of the larynx. **Head & neck**, v. 33, n. 5, p. 702-707, 2011.
- FITZMAURICE, Christina et al. The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 4, p. 505-527, 2015.
- GILLISON, M L et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **Journal Of National Cancer Institute**, v. 92, n. 9, p.709-20, maio 2000.
- GLASSMAN, Patrick M.; BALTHASAR, Joseph P. Mechanistic considerations for the use of monoclonal antibodies for cancer therapy. **Cancer biology & medicine**, v. 11, n. 1, p. 20, 2014.
- GUPTA, Rajnish A. et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1071-1076, 2010.
- HAKAMI, Fahad et al. The roles of HOXD10 in the development and progression of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **British journal of cancer**, v. 111, n. 4, p. 807-816, 2014.
- HAMA, T et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncologist**, v. 14, n. 9, p.2009-58, set. 2009.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011.
- HASHIBE, M. et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, p. 541-550, 2009.
- HASSAN, Nur Mohammad Monsur et al. Aberrant expression of HOX genes in oral dysplasia and squamous cell carcinoma tissues. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 16, n. 5, p. 217-224, 2006.
- HOFFMANN, Dietrich; HOFFMANN, Ilse; EL-BAYOUMY, Karam. The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. **Chemical research in toxicology**, v. 14, n. 7, p. 767-790, 2001.
- LIU, Tian-Run et al. Decreased expression of SATB2: a novel independent prognostic marker of worse outcome in laryngeal carcinoma patients. **PloS one**, v. 7, n. 7, 2012.
- IMBODEN, John B.; STONE, John H. **CURRENT: Reumatologia-: Diagnóstico e Tratamento**. McGraw Hill Brasil, 2014
- KUPER H, ADAMI H O, BOFFETTA P (June 2002). "Tobacco use, cancer causation and public health impact". *Journal of Internal Medicine* 251 (6): 455–66
- JACKMAN, S M et al. Plac1 (placenta-specific 1) is essential for normal placental and embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, p.564-572, ago. 2012.
- JEMAL, Ahmedin et al. Cancer statistics, 2007. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 57, n. 1, p. 43-66, 2007.

JEMAL, Ahmedin et al. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

KESTING, M R et al. Results of esophagogastroduodenoscopy in patients with oral squamous cell carcinoma--value of endoscopic screening: 10-year experience. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 67, n. 8, p.1649-1655, ago. 2009.

KINOSHITA, Denise. Alterações do sistema imunológico relacionadas ao envelhecimento e suas consequências. **Revista da Universidade Ibirapuera-São Paulo**, v. 6, p. 11-19, 2014.

KREIMER, Aimee R. et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 2, p. 467-475, 2005.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K. **Robbins e Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1480 p.

LEEMANS, C R; BRAAKHUIS, B J; BRAKENHOFF, R H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature Review Cancer**, v. 11, n. 1, p.9-22, jan. 2011.

LI, Yong et al. HOXC8-dependent cadherin 11 expression facilitates breast cancer cell migration through Trio and Rac. **Genes & cancer**, v. 2, n. 9, p. 880-888, 2011.

MAO, L et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. **Nature Medicine**, v. 2, n. 6, p.682-685, jun. 1996.

MARIONI, Gino et al. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. **Cancer treatment reviews**, v. 32, n. 7, p. 504-515, 2006.

MARKOU, K. et al. Laryngeal cancer: epidemiological data from Northern Greece and review of the literature. **Hippokratia**, v. 17, n. 4, p. 313, 2013.

MENACH, P.; OBURRA, H.O.; PATEL, A. Cigarette smoking and alcohol ingestion as risk factors for laryngeal squamous cell carcinoma at Kenyatta national hospital, Kenya. **Clin Med Insights Ear Nose Throat.**, p. 17-24, 2012.

MOON, Sung-Min et al. HOXC6 is deregulated in human head and neck squamous cell carcinoma and modulates Bcl-2 expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 42, p. 35678-35688, 2012.

NAKAYAMA, Ikue et al. Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells. **International journal of oncology**, v. 43, n. 1, p. 63-71, 2013.

OGDEN, G R. Alcohol and oral cancer. **Alcohol**, v. 35, n. 3, p.169-173, abr. 2005.

O'SULLIVAN, Brian; SHAH, Jatin. New TNM staging criteria for head and neck tumors. In: **Seminars in surgical oncology**. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2003. p. 30-42..

-
-
- PAPADAS, Theodoros A. et al. Survival after laryngectomy: a review of 133 patients with laryngeal carcinoma. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 267, n. 7, p. 1095-1101, 2010.
- PATEL, Snehal G.; SHAH, Jatin P. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 4, p. 242-258, 2005
- PFISTER, David G. et al. Head and Neck Cancers, Version 1.2015. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 13, n. 7, p. 847-856, 2015.
- PLOWRIGHT, L. et al. HOX transcription factors are potential therapeutic targets in non-small-cell lung cancer (targeting HOX genes in lung cancer). **British journal of cancer**, v. 100, n. 3, p. 470-475, 2009.
- PULTE, Dianne; BRENNER, Hermann. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. **The Oncologist**, v. 15, n. 9, p. 994-1001, 2010.
- REICHERT, Janice M.; VALGE-ARCHER, Viia E. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 5, p. 349-356, 2007.
- RILEY, James C. Estimates of regional and global life expectancy, 1800-2001. **Population and development review**, p. 537-543, 2005.
- RIVERA, César et al. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in Chilean population. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 9, p. 5968, 2014.
- ROTHENBERG, S M; ELLISEN, L W. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. **The Journal Of Clinical Investigation**, v. 6, n. 122, p.1951-7, jun. 2011.
- RUDOLPH, E et al. Effects of tumour stage, comorbidity and therapy on survival of laryngeal cancer patients: a systematic review and a meta-analysis. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 2, n. 268, p.165-79, fev. 2011.
- SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2015. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.
- SIMPSON, Andrew JG et al. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 8, p. 615-625, 2005.
- SHAH J.P., KARNELL L.H., HOFFMAN H.T. et al: Patterns of care for cancer of the larynx in the United States. **Arch Otolaryngol Head Neck Surgery**, v. 123: p. 475-483, 1997.
- SHARPE, Daniel J. et al. POU2F1 activity regulates HOXD10 and HOXD11 promoting a proliferative and invasive phenotype in Head and Neck cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 18, p. 8803, 2014.
- SOBIN, Leslie H.; GOSPODAROWICZ, Mary K.; WITTEKIND, Christian (Ed.). **TNM classification of malignant tumours**. John Wiley & Sons, 2011.

-
-
- SOUNDARARAJAN, Rama; RAO, A Jagannadha. Trophoblast 'pseudo-tumorigenesis': Significance and contributory factors. **Reproductive Biology And Endocrinology**, v. 2, n. 15, p.1-12, mar. 2004.
- STEIN S, FRITSCH R, LEMAIRE L, KESSEL M. Checklist: vertebrate homeobox genes. **Mechanisms of Development**. 1996; 55: 91-108.
- SCHÜNKE, Michael et al. **Thieme atlas of anatomy: Neck and internal organs**. Thieme, 2006.
- SZCZEPANSKI, M.J. et al. Assessment of expression of toll-like receptors 2, 3 and 4 in laryngeal carcinoma. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 264, p. 525-530, 2007.
- TAKES, R P et al. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects. **Oral Oncology**, v. 48, n. 9, p.775-779, set. 2012.
- TUNG, Chun-liang et al. Proteomics-based identification of plasma biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 1, n. 75, p.7-17, mar. 2013.
- WALTREGNY, David et al. Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. **The prostate**, v. 50, n. 3, p. 162-169, 2002.
- WIGHT, A J; OGDEN, G R. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. **Oral Oncology**, v. 34, n. 6, p.441-447, nov. 1998.
- YANG, W V et al. Potential biomarkers for the cytologic diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **Journal Of Dental Sciences**, v. 5, n. 2, p.60-69, jun. 2010.
- YU, Q.; ZHANG, X.; JI, C.; YANG, H.; GAO, M.; HONG, S.; HU, G. Survival analysis of laryngeal carcinoma without laryngectomy, radiotherapy, or chemotherapy. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v.269, p. 2103-2109, 2012.
- ZHANG, Si-yi et al. Retrospective Analysis of Prognostic Factors in 205 Patients with Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. **Plos One**: E60157, v. 8, n. 4, abr. 2013.
- zurHAUSEN, Harald. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Review Cancer**, v. 2, n. 5, p.342-350, maio 2002.