

# Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço

## *Genetic Changes in Head and Neck Cancer*

Jucimara Colombo<sup>1</sup>, Paula Rahal<sup>2</sup>

### Resumo

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) constitui o quinto tipo de câncer mais comum mundialmente, com uma incidência anual global de 780.000 novos casos. Os sítios comuns incluem cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe, cavidade nasal, seios paranasais, laringe e glândulas salivares. O consumo de tabaco e/ou álcool são os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do HNSCC. Apesar dos recentes avanços no tratamento, o índice de sobrevivência dos pacientes com HNSCC tem permanecido em 40%. A recidiva locorregional e a metástase após terapia convencional parecem ser os principais fatores que contribuem para a sobrevivência reduzida dos pacientes. O desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço é um processo multipasso acompanhado por mudanças genéticas e epigenéticas, incluindo perda de heteroziguidade, inativação gênica por metilação e amplificação gênica. Diferentes estudos têm revelado numerosas alterações moleculares em HNSCC, incluindo ativação de oncogenes, tais como: *EGFR*, *ciclina D1* e *COX-2*; inativação de genes supressores tumorais, tais como: *TP53*, *p16*, *p27* e *WAF1/CIP1*; e expressão de fatores angiogênicos e metastáticos; além dos polimorfismos genéticos de enzimas metabólicas. Esta revisão apresenta informações atuais sobre as principais alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, as quais apresentam potencial valor prognóstico, e discute alguns fatores que contribuem para a controvérsia a respeito de sua importância prognóstica.

**Palavras-chave:** Câncer de cabeça e pescoço; Carcinogênese multipasso; Alterações genéticas; Oncogene; Gene supressor tumoral; Polimorfismos

<sup>1</sup>Doutora em Genética pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Departamento de Biologia

<sup>2</sup>Livre-Docente em Microbiologia da UNESP, IBILCE, Departamento de Biologia

Endereço para correspondência: Paula Rahal. Departamento de Biologia do IBILCE - Rua Cristóvão Colombo, 2.265 - Jardim Nazareth - São José do Rio Preto (SP), Brasil - CEP: 15054-000. E-mail: rahalp@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço ocupa a quinta posição na lista das neoplasias mais frequentes, com uma incidência mundial estimada de 780.000 novos casos por ano. O principal tipo histológico é o HNSCC, correspondendo a cerca de 90% dos casos. Os sítios anatômicos que estão incluídos nesse grupo de neoplasias constituem a cavidade oral, que compreende mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua, soalho de língua; faringe, que inclui: orofaringe, nasofaringe, hipofaringe; cavidade nasal e seios paranasais; laringe glótica e supraglótica; e glândulas. A ocorrência aproximada é de 40% na cavidade oral, 15% na faringe e 25% na laringe, sendo o restante nos demais sítios remanescentes<sup>1</sup>.

Esse grupo de neoplasias é mais frequente no sexo masculino do que no feminino. No Brasil, as estimativas referem-se apenas ao câncer oral, sendo estimados, para o ano de 2008, 10.380 novos casos de câncer oral entre os homens e 3.780 entre as mulheres, ocupando, dessa forma, a sétima posição entre as neoplasias mais frequentes no Brasil<sup>2</sup>.

O principal fator etiológico para o seu desenvolvimento é o consumo combinado de tabaco e álcool, os quais são mencionados conjuntamente porque fumantes tendem a ser etilistas e vice-versa. Além disso, a exposição a esses fatores parece atuar sinergisticamente, sendo o risco de câncer, associado com a exposição combinada de álcool e fumo, mais pronunciado na parte superior da laringe quando comparada à parte inferior<sup>3</sup>.

Outros cofatores que podem contribuir para a carcinogênese de cabeça e pescoço incluem a poluição ambiental e certas condições de trabalho associadas a indústrias como a metalurgia e a petroquímica, assim como a nutrição, a má dentição e a predisposição e suscetibilidade genética<sup>4</sup>. Alguns estudos também têm demonstrado que infecção por HPV (*Human Papillomavirus*), principalmente dos tipos 16 e 18, e Epstein-Barr vírus também desempenham papel na etiologia do HNSCC, especialmente nas regiões nasofaríngeal e orofaríngeal<sup>3,4</sup>.

Em relação à nutrição, estudos epidemiológicos relatam que o consumo de frutas e vegetais ricos em vitaminas A e C e em betacaroteno estão inversamente relacionados ao risco de câncer oral, enquanto a carne e a pimenta vermelha são consideradas fatores de risco<sup>3</sup>.

Embora seja bem aceito o fato de que há uma elevação da incidência de HNSCC com a idade, sendo 64 anos a média de idade de apresentação da doença, alguns trabalhos relatam aumento do número de casos de câncer oral em jovens, mesmo entre aqueles que não consomem álcool e fumo, o que reforça a participação

de outros fatores etiológicos na carcinogênese de cabeça e pescoço como, por exemplo, a predisposição e a suscetibilidade genética<sup>1,3</sup>.

Pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço frequentemente desenvolvem lesões múltiplas em diferentes sítios anatômicos, estando esse padrão multifocal de acordo com o modelo proposto por Slaughter *et al.*, em 1953<sup>5</sup>, denominado "cancerização de campo". Esse modelo baseia-se na exposição repetida de um campo aos mesmos fatores de risco, como os carcinógenos presentes no álcool e no tabaco, levando ao desenvolvimento de lesões independentes.

O estabelecimento do planejamento terapêutico e do prognóstico dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço baseiam-se principalmente em parâmetros clínicos, radiológicos e histopatológicos, os quais consistem no local do tumor primário e no sistema de estadiamento TNM, ou seja, no tamanho do tumor, na presença de metástase em linfonodos cervicais e de metástase a distância<sup>6</sup>. É bastante aceito que a presença de metástase em linfonodos cervicais é o principal fator prognóstico adverso independente<sup>1,6</sup>. O câncer de laringe, especialmente o supraglótico, frequentemente apresenta infiltração local e metástase em linfonodos cervicais. No entanto, tumores apresentando o mesmo estadiamento clínico podem demonstrar padrões de crescimento e evolução diferentes, sugerindo a necessidade da análise de outros fatores complementares capazes de nortear com maior precisão o prognóstico da doença<sup>6</sup>.

Dessa forma, apesar das abordagens de tratamento agressivas e multidisciplinares, o índice de sobrevivência de cinco anos permanece inalterado nos últimos 40 anos e apenas 30% a 40% dos pacientes atingem tal índice. As falhas no tratamento ocorrem na forma de recorrência locorregional, a qual afeta aproximadamente 60% dos pacientes, metástase a distância desenvolvida em 15% a 25% dos pacientes, bem como o aparecimento de um segundo tumor primário<sup>6</sup>.

Como as neoplasias de cabeça e pescoço consistem em um grupo de tumores muito heterogêneos, com características clínicas diferentes, nos últimos anos, têm sido investigados marcadores moleculares que auxiliem no seu diagnóstico precoce e prognóstico, assim como na identificação de populações de risco e de marcadores que possam ser utilizados como alvos terapêuticos<sup>7</sup>.

No entanto, apesar das incessantes pesquisas focadas no comportamento biológico e nas características moleculares dos carcinomas de cabeça e pescoço, eles persistem como um alto fator de morbidade, sendo a detecção tardia o principal fator associado a baixas taxas de sobrevida. A combinação de fatores prognósticos já

estabelecidos com parâmetros moleculares pode trazer benefícios aos pacientes. Nesse sentido, fatores prognósticos com maior sensibilidade e especificidade poderiam oferecer certamente subsídios para novas estratégias terapêuticas. A utilização de marcadores moleculares apresenta-se também como um promissor auxílio na detecção do câncer nos estádios mais precoces, ou eventualmente lesões pré-invasivas, favorecendo os pacientes não apenas com a elevação da sobrevida, mas também pela utilização de tratamentos associados à menor morbidade. Os marcadores moleculares também exercem importante função no seguimento dos pacientes, uma vez que a recidiva tumoral, bem como a possibilidade de cura, podem ser avaliadas<sup>8</sup>.

Os estudos citogenéticos moleculares têm evidenciado várias regiões cromossômicas consistentemente alteradas nesses tumores, envolvendo ganhos em 3q, 5p, 7q, 8q, 9q, 11q13 e 20q e perdas em 3p, 5q, 8p, 9p, 13q, 18q, 21q. Entre as alterações estruturais recorrentes, podem ser citados os isocromossomos do 8q, deleções do 3p e regiões homogeneamente coradas em 11q13, sendo as perdas de 3p e 9p consideradas eventos precoces na tumorigênese de cabeça e pescoço<sup>8,9</sup>.

Vários outros estudos citogenéticos e moleculares também investigaram a ocorrência de alterações genéticas em tumores de cabeça e pescoço, demonstrando que ativação de oncogenes, tais como: *ciclina D1*, *H-ras*, *c-myc*, *EGFR*; e inativação de genes supressores de tumor, como: *P16*, *TP53*, *P21* estão envolvidas no desenvolvimento da doença<sup>1,4,7,9</sup>.

## ONCOGENES

Os oncogenes são derivados de alterações em proto-oncogenes celulares, os quais codificam proteínas que mediam sinais positivos para o crescimento celular e/ou sobrevivência celular. Quando um proto-oncogene está alterado e anormalmente ativado, torna-se um oncogene, podendo promover a proliferação celular anormal e levar à tumorigênese. Alguns dos mecanismos comuns de ativação de oncogenes incluem: mutações, translocações cromossômicas, amplificação gênica e inserção retroviral<sup>4</sup>.

### RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGFR)

O gene do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), localizado em 7p12, codifica um receptor transmembrana que se liga ao fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) e outras proteínas regulatórias. A família EGFR inclui: EGFR, HER-2/neu (c-erbB), HER-3 (c-erbB-3) e HER-4 (c-erbB-4)<sup>10</sup>.

Os eventos de sinalização *downstream*, após a ligação de EGFR aos seus ligantes, incluem ativação de tirosina quinase e ativação de Ras intracelular, Raf (*v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1*) e cascatas de proteínas quinases que estão envolvidas na transformação maligna e crescimento do tumor por meio da inibição de apoptose, proliferação celular, promoção da angiogênese e metástase<sup>9</sup>.

A expressão de *EGFR* tem sido extensivamente estudada em HNSCC e sua superexpressão observada em 34% a 80% dos casos, utilizando técnicas de imuno-histoquímica. Esse marcador tem sido significativamente associado com sobrevivência global e sobrevivência livre de doença reduzida, bem como prognóstico reservado em pacientes com HNSCC, principalmente em tumores de laringe<sup>1</sup>.

A superexpressão de *EGFR* também tem sido associada com recidiva em nódulos cervicais e aumento da resistência do tumor à quimioterapia e radioterapia em pacientes com carcinoma de laringe. Esses dados sugerem que a avaliação da expressão de *EGFR* no momento do diagnóstico pode ajudar a identificar pacientes que têm risco aumentado de metástases cervicais e que seriam beneficiados com a realização de tratamentos mais agressivos<sup>10</sup>. Além disso, a superexpressão de *EGFR* associada à coexpressão de *Her2* e *Her3*, os quais não têm atividade tirosina quinase intrínseca, tem sido correlacionada com aumento da atividade transformante e baixa taxa de sobrevivência dos pacientes<sup>6</sup>.

Embora outros estudos não tenham encontrado associação entre *EGFR* com fatores prognóstico e estágio clínico, o significado prognóstico de *EGFR* em HNSCC, em um grande número de estudos, tem dirigido o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para bloquear o sistema de transdução de sinal de *EGFR* e teoricamente diminuir o desenvolvimento tumoral<sup>4,10</sup>.

### CICLINA D1

As ciclinas são extremamente importantes durante o ciclo celular e são divididas em quatro tipos: A, B, D e E. A *ciclina D1* também chamada de *PRAD1* é um proto-oncogene que responde a mitógenos extracelulares e é um controlador da progressão da fase G1 no ciclo celular. O complexo cdk4/6-ciclina D1 estimula a progressão do ciclo celular por fosforilar a proteína pRB. A fosforilação de pRB por tais complexos em G1 libera fatores de transcrição, tais como: E2F, que induz a expressão gênica e mudanças metabólicas levando à replicação do DNA. Dessa forma, a ciclina D1 é essencial para a progressão da fase G1 do ciclo celular<sup>11</sup>.

A mais comumente alteração de ciclina D1 é a amplificação do gene localizado em 11q13, região

cromossômica, na qual já foram identificados outros proto-oncogenes como *bcl-1*, *int-2*, *hst-1*, *sem-1*, *EMS-1*. A amplificação do gene resulta na superexpressão de uma proteína estruturalmente normal, mas em níveis altos que levam a célula a um estado de proliferação descontrolada. A amplificação e/ou a superexpressão de Ciclina D1 tem sido encontrada em cerca de 17-70% das amostras de HNSCC, utilizando técnicas de imunohistoquímica, FISH ou RT-PCR<sup>4,7</sup>.

A amplificação e/ou superexpressão da proteína estruturalmente normal ciclina D1 tem sido significativamente correlacionada com extensão do tumor, metástase em linfonodos regionais e estágio clínico avançado<sup>9</sup>. Outros estudos também têm evidenciado que alterações em ciclina D1 constituem um marcador de prognóstico de sobrevivência livre de doença e sobrevivência global reduzidas. No entanto, outros estudos não mostraram associação entre alterações de ciclina D1 e sobrevivência em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Embora o significado prognóstico da ciclina D1 permaneça controverso, dados correntes sugerem uma correlação entre superexpressão de ciclina D1 e prognóstico reservado<sup>1</sup>.

## CICLO-OXIGENASE 2 (COX-2)

As enzimas ciclo-oxigenases (Cox) catalizam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos. Duas isoformas de ciclo-oxigenases foram descritas, Cox-1 e Cox-2. Embora a Cox-1 seja constitutivamente expressa em vários tecidos, a expressão de Cox-2 não é detectada na maioria dos tecidos e pode ter um importante papel na progressão do carcinoma de cabeça e pescoço. A expressão de Cox-2 pode ser induzida por vários estímulos, incluindo uma variedade de citocinas, hormônios e agentes mutagênicos como o benzopireno. A enzima Cox-2 contribui para a carcinogênese por catalizar a síntese de mutágenos; diminuir o índice de apoptose; estimular a inflamação, a imunossupressão e a angiogênese; e por aumentar o potencial de invasão e metástase<sup>12</sup>.

A expressão citoplasmática de Cox-2 tem sido observada em 70-88% das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, utilizando técnicas de imunohistoquímica e, em 87% das amostras, usando RT-PCR. Além disso, alguns estudos mostram que a expressão de Cox-2 é significativamente maior em amostras de pacientes com metástase em linfonodos cervicais e em tumores avançados, assim como em tumores pobremente diferenciados. A expressão de Cox-2 também tem se revelado um marcador de prognóstico significativo em pacientes com lesões pré-malignas e

um preditor independente para intervalo livre de doença<sup>13</sup>. De modo contrário, outros estudos realizados não encontraram correlação entre expressão de Cox-2 e parâmetros clínicos e prognósticos em pacientes com carcinoma de laringe. Apesar desses resultados, numerosos estudos em outros tipos de neoplasias sugerem que a atividade de Cox-2 é importante na progressão de neoplasias epiteliais<sup>6</sup>.

## GENES SUPRESSORES TUMORAIS

Os genes supressores tumorais codificam proteínas que transmitem sinais negativos regulatórios do crescimento celular. Esses genes estão frequentemente envolvidos na regulação do ciclo celular, incluindo parada do ciclo celular e apoptose. Uma vez que esses genes estão inativados, as células escapam do controle do ciclo celular, levando à divisão celular descontrolada, contribuindo para o fenótipo maligno<sup>4</sup>.

### TP53

O gene supressor de tumor *TP53*, localizado em 17p13, está envolvido em muitas funções relacionadas à manutenção da integridade celular após danos ao DNA e controle do ciclo celular. Disfunções desse gene estão envolvidas em muitos tipos de tumores, incluindo câncer de cabeça e pescoço<sup>9,13</sup>.

A produção da proteína p53 é aumentada em resposta a danos no DNA, induzindo parada no ciclo celular na transição G1/S; no entanto, se o dano for irreparável, a proteína p53 pode iniciar a morte celular por apoptose. Em células normais, a concentração de p53 é baixa e sua meia vida é curta, por volta de 20 minutos. De modo contrário, se o gene *TP53* estiver mutado, o seu produto proteico está frequentemente presente em altas concentrações<sup>14</sup>.

Mutações no gene *TP53*, principalmente nos éxons 5-8 ou 5-9, têm sido registradas em cerca de 60% dos casos de câncer de cabeça e pescoço, e podem ser mutações de ponto, deleções ou inserções. Alguns estudos têm mostrado que mutações desse gene estão associadas com aumento do risco de recorrência locorregional e prognóstico reservado. Outros estudos sugerem também que a superexpressão da proteína p53 mutada está associada com índices reduzidos de sobrevivência global e sobrevivência livre de doença em pacientes com HNSCC, principalmente câncer de laringe<sup>13</sup>.

No entanto, a correlação entre a expressão da proteína p53 e a evolução clínica em pacientes com HNSCC permanece bastante controversa. Embora muitos estudos tenham correlacionado mutações e/ou superexpressão de p53 com prognóstico reservado, outros têm mostrado

que esses eventos são independentes do prognóstico e da evolução clínica da doença<sup>9</sup>.

Além de eventos mutacionais, outros mecanismos de inativação, tais como: presença de HPV e desregulação em outros componentes da cascata de sinalização, têm sido registrados. Em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço positivos para HPV, isso pode ocorrer por meio da interação de p53 com a proteína E6 codificada pelos tipos oncogênicos de HPV, principalmente HPV 16 e 18. Outros mecanismos envolvem a proteína *double minute 2* (MDM2) que liga-se à p53 e promove a ubiquitinação da região C-terminal de p53 e sua subsequente degradação<sup>14</sup>.

### P16

A proteína p16 é codificada pelo gene supressor tumoral *CDKN2A*, localizado em 9p21. A perda de 9p é considerada um evento precoce na carcinogênese de cabeça e pescoço, pois pode ser observada em displasias e em carcinomas *in situ*. A proteína p16 liga-se às quinases dependentes de ciclina (cdks) 4 e 6, inibindo sua associação com a ciclina D1. A inibição do complexo cdk4/6-ciclina D1 previne a fosforilação da pRB, levando consequentemente à inibição da transição G1/S do ciclo celular<sup>9</sup>.

Perda de expressão do gene *P16*, por deleções homozigotas e eventos epigenéticos como metilação, está presente em 52% a 82% das amostras de HNSCC e pode ser observada usando técnicas como imuno-histoquímica e RT-PCR. Essas alterações têm sido associadas com desenvolvimento de metástase a distância e diminuição da sobrevida dos pacientes<sup>11</sup>. Além disso, estudo realizado por Bazan *et al.*<sup>15</sup> considerou que mutações no gene *p16* constituem um fator preditivo independente para recidiva da doença.

Contudo, há resultados conflitantes a respeito do significado prognóstico do gene *P16* em câncer de cabeça e pescoço, pois outros estudos não confirmam a associação entre perda de expressão desse gene com desenvolvimento de metástase e sobrevida reduzida dos pacientes. Estudos pré-clínicos, utilizando RNA de interferência, que constitui um mecanismo de silenciamento gênico, podem ajudar a elucidar o significado e importância da perda de expressão de *p16* em HNSCC<sup>6</sup>.

### P21<sup>WAF1/CIP1</sup>

O inibidor de quinase dependente de ciclina p21<sup>WAF1/CIP1</sup> codificado pelo gene *WAF1/CIP1*, localizado em 6p21.2, tem um papel importante na regulação da transcrição G1/S do ciclo celular. A proteína p21<sup>WAF1/CIP1</sup> atua como um dos principais efetores *downstream* da proteína

p53. Em resposta a danos no DNA, a proteína p53 selvagem acumula e liga-se na região promotora do gene *WAF1/CIP1* e induz a expressão da proteína p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, a qual inibe a atividade dos complexos quinase dependente de ciclina, levando à parada do ciclo celular. A expressão da proteína p21<sup>WAF1/CIP1</sup> também pode ser induzida por um modelo independente de p53, como: drogas genotóxicas e fatores de crescimento. Esse gene também tem sido implicado nos mecanismos de apoptose e senescência celular<sup>16</sup>.

Mutações de *WAF1/CIP1* frequentemente ocorrem em tumores malignos, sendo que a proteína mutada é incapaz de bloquear o ciclo celular e acumula-se no núcleo da célula. O acúmulo da proteína no núcleo pode ser observado por imuno-histoquímica. Alguns estudos indicam que a superexpressão da proteína p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mutada está associada com prognóstico reservado em vários tipos de neoplasias. Dessa forma, alguns estudos têm observado uma correlação positiva entre a superexpressão de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> e prognóstico reservado, bem como maior grau de agressividade em carcinoma oral<sup>7,9</sup>.

No entanto, o seu papel como preditor de prognóstico em neoplasias permanece controverso, pois outros estudos não apoiam a associação de superexpressão de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> com prognóstico reservado em tumores malignos<sup>1</sup>.

### P27

O gene *P27* ou *Kip1*, localizado em 12p13.1-p12, é um inibidor de quinase dependente de ciclina, que regula negativamente a progressão da fase G1 do ciclo celular pela ligação ao complexo ciclina e quinase dependente de ciclina 2. A proteína p27 é ativada em resposta a sinais extracelulares como inibição por contato, TGF- $\beta$ , ciclina-AMP. Os níveis da proteína p27 estão aumentados em células quiescentes e diminuem rapidamente após a célula ser estimulada por mitógenos. A abundância celular dessa proteína apresenta regulação pós-transcricional pelo modelo ubiquitina-proteossomo<sup>1</sup>.

A expressão reduzida da proteína p27 tem sido associada com progressão em lesões pré-cancerosas da laringe, indicando *p27* como um potencial gene supressor tumoral. Em estudo realizado por Choi *et al.*<sup>17</sup>, uma correlação significativa foi encontrada entre a baixa expressão de p27 e tumores de cabeça e pescoço de alto grau, estágios T avançado e presença de metástase em linfonodos cervicais. Dessa forma, a proteína p27 tem um papel importante no controle do ciclo celular e carcinogênese, sendo que a sua baixa expressão tem sido associada a um prognóstico reservado em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Adicionalmente, estudos recentes indicam que a proteína Jab1 (*human Jun activation domain-binding protein 1*), a qual foi originalmente identificada como um coativador do gene AP-1 envolvido no controle da proliferação celular, participa também da degradação da proteína p27 via sistema ubiquitina-proteosoma, sendo a sua expressão inversamente associada com o nível de p27. Estudos indicam ainda que a combinação de expressão aumentada de Jab1 e baixa expressão de p27 estão associadas com variáveis clínicas desfavoráveis como sobrevivência global e sobrevivência livre de doença baixa, metástase em linfonodos em alguns tipos de neoplasias, dentre elas câncer de cabeça e pescoço, especialmente tumor de laringe<sup>18</sup>.

## GENES ENVOLVIDOS EM ANGIOGÊNESE

A angiogênese é o processo de formação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes, e seu processo depende da motilidade, proliferação e formação de células endoteliais, sendo essencial para o desenvolvimento embrionário, formação de órgãos, reprodução, regeneração e remodelação tecidual. Sob certas condições patológicas, como carcinogênese, um fenótipo angiogênico pode ocorrer devido à superexpressão de fatores angiogênicos e à baixa expressão de inibidores de angiogênese. Estudos recentes indicam que a aquisição de um fenótipo angiogênico ocorre antes do tumor adquirir propriedades invasivas, sendo, portanto, essencial para o crescimento local do tumor, bem como para o desenvolvimento de metástase<sup>19</sup>.

A família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) contém proteínas altamente potentes e específicas que atuam no aumento da permeabilidade dos vasos, crescimento, proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais, por meio da ligação às quinases receptoras de tirosinas específicas<sup>6</sup>.

Os níveis citoplasmáticos de VEGF, em pacientes com HNSCC, têm sido estudados usando técnicas de imuno-histoquímica em amostras tumorais parafinadas. A expressão aumentada de VEGF-A e VEGF-C, os quais atuam na regulação da linfangiogênese, tem sido observada em linhagem celular e em amostras clínicas de pacientes com HNSCC. Estudos indicam ainda que os níveis de VEGF-A e/ou VEGF-C em neoplasias de cabeça e pescoço em estágio inicial são fatores preditivos independentes para metástase em linfonodos cervicais. A expressão aumentada dessas proteínas também tem sido associada com sobrevivência global reduzida em pacientes com HNSCC em estágio avançado, isto levanta a possibilidade de que a avaliação dos níveis de VEGF-A e VEGF-C em HNSCC inicial pode ajudar a identificar

pacientes com risco elevado de metástase, podendo dirigi-los para tratamentos mais apropriados<sup>6,19</sup>.

No entanto, alguns estudos têm questionado o valor prognóstico de VEGF e seu papel em promover comportamento invasivo e agressivo em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Um fator que contribui para esses resultados discrepantes é a falta de técnicas diretas para medir a atividade angiogênica nos tecidos<sup>1</sup>.

Como o desenvolvimento de microvasos é importante para o crescimento e sobrevivência do tumor, bem como para o desenvolvimento de metástase, o bloqueio da vascularização do tumor constitui uma abordagem atrativa no tratamento do câncer. Estudos usando agentes biológicos, como angiostatina, isolados ou em combinação com quimioterapia, têm já se interado à clínica.<sup>1,4</sup>

## GENES ENVOLVIDOS EM METÁSTASE

### METALOPROTEASES DE MATRIZ (MMPs)

As metaloproteases de matriz (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas dependentes do zinco que estão envolvidas na degradação e remodelação de componentes da matriz extracelular, como: colágeno, elastina, fibronetina e gelatina. A família é subdividida em collagenases, gelatinases, estromelisinases, MMP tipo estromelisinases e MMP tipo membrana. Vários estudos têm evidenciado que as MMPs atuam na quebra da membrana basal e na degradação do estroma intersticial e, dessa forma, facilitam a invasão das células tumorais e consequentemente a metástase<sup>20</sup>.

Estudo pré-clínicos têm demonstrado, por meio de técnicas de imuno-histoquímica ou RT-PCR, que carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço expressam altos níveis de MMPs *in vivo*. As MMPs consistentemente encontradas superexpressas em câncer de cabeça e pescoço incluem MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-13 e MMP-14. As enzimas MMP-1, MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP são mais comumente identificadas em câncer de cabeça e pescoço e associadas com a progressão da doença<sup>6</sup>.

Estudos recentes mostram que MMP-2 e MMP-9, pertencentes à subfamília das gelatinases, têm função de digestão do colágeno tipo IV, o principal componente da membrana basal. Além disso, observa-se que a expressão aumentada de gelatinases tem significativa correlação com estágio, metástase em linfonodos e prognóstico reservado em câncer de cabeça e pescoço, principalmente em câncer oral e de laringe. A MT1-MMP, pertencente à família das MMP tipo membrana,

além de degradar colágeno tipo I e outros componentes da matriz, também ativa MMP-2. Dessa forma, é considerada uma enzima crítica no controle da atividade proteolítica. O HNSCC foi um dos primeiros tumores nos quais a enzima MT1-MMP foi identificada<sup>20</sup>.

As MMPs podem ser inativadas por inibidores de MMPs de ocorrência natural (TIMPs). No entanto, as TIMPs também apresentam outras funções biológicas, por exemplo, TIMP-2 é necessária para a ativação de pró-MMP-2. Dessa forma, a superexpressão de TIMPs também tem sido associada com prognóstico reservado em pacientes com HNSCC<sup>21</sup>.

Embora estudos indiquem que a inibição das MMPs, *in vitro* e em modelos animais, diminui invasão e metástase de células tumorais, as terapias clínicas para inibidores de MMPs têm falhado em demonstrar uma significativa vantagem de sobrevida em seres humanos. A discrepância entre esses estudos tem levado a uma reavaliação da atuação das MMPs no desenvolvimento do câncer e no desenho de novos alvos terapêuticos. Outro ponto a ser considerado é quanto à complexidade da regulação pós-transcricional das MMPs; como essa família de enzimas requer processamento para a sua ativação, a análise de expressão gênica ou proteica não prediz completamente sua atividade catalítica<sup>20</sup>.

#### ATIVADOR DE PLASMINOGÊNIO TIPO UROQUINASE (PLAU)

Outras proteases também demonstram desempenhar um papel no desenvolvimento de HNSCC. O ativador de plasminogênio tipo uroquinase (PLAU) tem participação tanto no processo de angiogênese como no processo de invasão das células tumorais. Essa enzima ao converter o plasminogênio em plasmina liga-se ao seu receptor celular, u-PAR, o que leva à ativação de MMPs. Dessa forma, há interações recíprocas entre as enzimas PLAU e MMPs que levam à degradação da matriz extracelular. Estudos mostram que o PLAU e seu receptor u-PAR encontram-se superexpressos em HNSCC, embora pareça não haver correlação com parâmetros clínicos<sup>22</sup>.

#### GENES DE SUSCEPTIBILIDADE

Vários estudos epidemiológicos demonstram que o consumo combinado de álcool e fumo constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço. Embora muitos indivíduos estejam expostos a estes fatores de risco, somente uma parcela desenvolve câncer, sugerindo que diferenças genéticas individuais influenciam a carcinogênese<sup>23</sup>.

O tabaco consiste em uma complexa mistura de mais de 4.000 substâncias, das quais pelo menos 50 são

carcinogênicas, entre elas destacam-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), nitrosaminas, aldeídos e aminas aromáticas que podem formar adutos de DNA após sua ativação metabólica e induzir muitos tipos de mutações<sup>3,4</sup>.

Em relação ao álcool, os possíveis mecanismos pelos quais seu consumo pode aumentar o risco de câncer incluem a carcinogenicidade do acetaldeído, um metabólito do álcool, que forma adutos de proteínas, resultando na produção de anticorpos, inativação de enzimas e prejuízos no sistema de reparo do DNA. O álcool pode agir também como um solvente e facilitar a penetração de carcinógenos nos tecidos-alvos. Além disso, aumenta o índice de quebras no material genético e a peroxidação de lipídios e consequentemente a produção de radicais livres<sup>3,4</sup>.

No entanto, a maioria dos agentes mutagênicos e carcinogênicos requerem ativação metabólica para exercerem seus efeitos genotóxicos. Várias enzimas metabólicas estão envolvidas na ativação e destoxificação de compostos carcinogênicos ou pró-carcinogênicos, incluindo enzimas de Fase I, como álcool desidrogenase e citocromo P450, e de Fase II, como as glutatônicas S-transferases e N-acetil-transferases. Contudo, essas enzimas são polimórficas na população; e a variação individual na metabolização dos carcinógenos e pró-carcinógenos tem sido relacionada com a suscetibilidade diferencial ao câncer<sup>23,24</sup>.

O gene *CYP1A1*, membro da família do Citocromo P450, está envolvido na ativação de vários pró-carcinógenos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), os quais estão presentes na fumaça do cigarro e em certos alimentos. A expressão de *CYP1A1* é induzida por PAH, e o produto gênico é responsável pelo primeiro passo de ativação de PAH. A transição de timina a citosina, na base 264, abaixo do sítio de poliadenilação de *CYP1A1*, gera um sítio de restrição para a enzima *MspI* e confere aumento da atividade catalítica do gene. Um outro polimorfismo caracteriza-se pela transição da adenina pela citosina, gerando a substituição do aminoácido isoleucina pela valina. Esses polimorfismos de *CYP1A1* já foram associados com maior suscetibilidade para neoplasias de pulmão, mama, próstata e de cabeça e pescoço<sup>24</sup>.

A *CYP2E1*, enzima de Fase I, está envolvida no metabolismo do etanol e acetona, além de catalizar a oxidação e formação de adutos a partir de vários compostos presentes na fumaça do cigarro, tais como: nitrosaminas e benzeno. Os polimorfismos na região promotora do gene *CYP2E1*, identificados por enzimas de restrição como *PstI* e *RsaI*, são correlacionados com

aumento da atividade transcricional do gene e consequente suscetibilidade aumentada para várias neoplasias, entre elas câncer de cabeça e pescoço<sup>24</sup>.

No entanto, outros estudos não apoiam a associação entre polimorfismos de *CYP1A1* e *CYP2E1* com risco aumentado de desenvolvimento de HNSCC<sup>25</sup>.

Entre as enzimas de fase II, destacam-se as glutationa-S-transferases, que são da família de enzimas citosólicas ou microsossomais, as quais catalizam numerosas reações de redução dependente da glutationa, gerando produtos extremamente hidrofílicos, os quais são facilmente excretados da célula. Há quatro distintas famílias de genes *GST* humanos:  $\alpha$ ,  $\theta$ ,  $\mu$ , e  $\pi$ . O gene *GSTM1*, pertencente à família  $\mu$  e localizado em 1p13.3, é responsável pela conjugação da glutationa a epóxidos derivados de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; o gene *GSTT1*, pertencente à família  $\theta$  e localizado em 22q11.2, é responsável pela destoxificação de monoalometanos, diclometanos e óxido de etileno. Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são altamente polimórficos entre as etnias; e vários estudos epidemiológicos sugerem que indivíduos homocigotos nulos para *GSTM1* e/ou *GSTT1* têm um risco aumentado para vários tipos de neoplasias<sup>23</sup>. Vários autores demonstraram uma associação do genótipo *GSTM1* nulo e HNSCC<sup>24</sup>, enquanto outros não<sup>25</sup>. Para o genótipo *GSTT1* nulo, também foi demonstrada uma relação<sup>25</sup>, em alguns casos, e ausência, em outros<sup>24</sup>.

A associação entre polimorfismos das enzimas que atuam na metabolização de xenobióticos e câncer de cabeça e pescoço não tem sido homogênea, possivelmente devido à etnia, estilo de vida ou fatores ambientais das populações estudadas, bem como a necessidade de avaliação simultânea de um maior número de enzimas metabolizadoras<sup>23</sup>.

## CONCLUSÕES

O desenvolvimento do HNSCC é um processo multipasso acompanhado por mudanças genéticas e epigenéticas, que inclui perda de heterozigotidade, inativação gênica por metilação e amplificação gênica, as quais podem alterar o perfil de expressão gênica<sup>4</sup>.

Avanços no conhecimento da patogênese e progressão do HNSCC têm estimulado o desenvolvimento de novos biomarcadores com potencial de aplicações clínicas, que podem beneficiar, por exemplo, pacientes que necessitem de modalidades de tratamento mais agressivas. Contudo, a maioria deles, isoladamente, tem mostrado insuficiente poder preditivo. Vários fatores podem contribuir para a falta de poder preditivo dos biomarcadores em HNSCC e

discordância entre os estudos. Esses fatores incluem variações na localização do tumor primário, pois a grande maioria dos estudos moleculares é realizada em amostras de pacientes com HNSCC sem distinção entre os diferentes sítios anatômicos; a sensibilidade das técnicas utilizadas; os anticorpos selecionados para a imunohistoquímica; a qualidade dos espécimes estudados; bem como a falta de técnicas diretas para medir atividade funcional. Outro ponto extremamente importante é quanto às diferenças nos protocolos de tratamento dos pacientes, as quais podem levar a diferenças nos índices de sobrevivência<sup>6</sup>.

No entanto, essas divergências também podem representar diferenças verdadeiras na biologia dos tumores, com base em seus diferentes subsítios e também em outros fatores que não são considerados como, por exemplo, infecção por HPV, como também a heterogeneidade intrínseca da doença.

A identificação de biomarcadores moleculares em HNSCC é extremamente importante, uma vez que os métodos clínicos e histopatológicos utilizados atualmente mostram-se insuficientes para prever evolução clínica e resposta a tratamento nos pacientes. Tal identificação poderá resultar em diagnósticos e prognósticos mais efetivos e em abordagens terapêuticas mais adequadas para essa neoplasia, que permanece como um dos mais frequentes e desfigurantes tumores que afetam tanto a duração como a qualidade de vida.

**Potencial Conflito de Interesses: Nada a Declarar**

## REFERÊNCIAS

1. Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, et al. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck* 2006 Mar;28(3):256-69.
2. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: URL: <http://www.inca.org.br>.
3. Döbrossy, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev* 2005 Jan;24(1):9-17.
4. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 2008 Jan;87(1):14-32. Review. Erratum *J Dent Res* 2008 Feb;87(2):191.
5. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953 Sep;6(5):963-8.
6. Thomas GR, Nadiminti H, Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and

- neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol* 2005 Dec;86(6):347-63.
7. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003 Oct;260(9):502-8.
  8. Belbin TJ, Singh B, Smith RV, Socci ND, Wreesmann VB, Sanchez-Carbayo M. Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005 Jan;131(1):10-8.
  9. Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer control* 2002 Sep-Oct;9(5):369-78.
  10. Ford AC, Grandis JR. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head Neck* 2003 Jan;25(1):67-73.
  11. Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M, Gornbein JA, Calcaterra TC, Slamon DJ, Wang MB, Srivatsan ES. Cyclin D1 amplification and P16 (MTS1/CDK4) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope* 2002 Mar;112(3):472-81.
  12. Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head Neck* 2002 Aug;24(8):792-9.
  13. Edstrom S, Cvetkovska E, Westin T, Young C. Overexpression of p53-related proteins predicts rapid growth rate of head and neck cancer. *Laryngoscope* 2001 Jan;111(1):124-30.
  14. Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2003 Apr;39(3):222-31.
  15. Bazan V, Zanna I, Migliavacca M, Sanz-Casla MT, Maestro ML, Corsale S, et al.. Prognostic significance of p16INK4a alterations and 9p21 loss of heterozygosity in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol* 2002;192: 286-93.
  16. Child ES, Mann DJ. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* 2006 Jun; 5(12):1313-9.
  17. Choi CS, Choi G, Jung KY, Choi JO, Chae YS. Low expression of p27(Kip1) in advanced mucoepidermoid carcinomas of head and neck. *Head Neck* 2001 Apr;23(4):292-7.
  18. Dong Y, Sui L, Watanabe Y, Yamaguchi F, Hatano N, Tokuda M. Prognostic significance of jab-1 expression in laryngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005 Jan 1;11(1):259-66.
  19. Onesto C, Hannoun-Lévi JM, Chamorey E, Formento JL, Ramaoli A, Pagès G. Vascular endothelial growth factor- $\alpha$  and Poly(A) binding protein-interacting protein 2 expression in human head and neck carcinomas: correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 2006 May 22;94(10):1516-23.
  20. Rosenthal EL, Matrisian LM. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* 2006 Jul;28(7):639-48.
  21. Culhaci N, Metin K, Copcu E, Dikicioglu E. Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. *BMC Cancer* 2004 Aug 3;4: 42.
  22. Pacheco MM, Kowalski LP, Nishimoto IN, Brentani MM. Differential expression of c-jun and c-fos mRNAs in squamous cell carcinoma of the head and neck: associations with uPA, gelatinase B, and matrilysin mRNAs. *Head Neck* 2002; 5: 705-15.
  23. Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, Arzani D, De Lauretis A, Cattel C, Almadori G, van Duijn CM, Paludetti G, Ricciardi G. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008 Jan;134(1):93-100.
  24. Gattas GJE, Carvalho MB, Siraque, MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, et al. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CY2PE1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck* 2006 Sep;28(9):819-26.
  25. Oude Ophuis MB, Manni JJ, Peters WH. Glutathione S-transferase T1 null polymorphism and risk for head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 2006 Mar;126(3):311-7.

### **Abstract**

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the fifth most common cancer worldwide, with a global yearly incidence of 780,000 new cases. Common sites include the oral cavity, oropharynx, hypopharynx, nasopharynx, nasal cavity, paranasal sinus, larynx and salivary glands. Tobacco and/or alcohol consumption are the two main risk factors involved in the development of HNSCC. Despite recent advances in treatment, the long-term survival rate of patients with head and neck squamous cell carcinoma has remained at 40%. Locoregional recurrence and metastasis after conventional therapy appear to be the major contributing factors for the restricted survival of patients. The development of HNSCC is a multistep process accompanied by genetic and epigenetic changes, including loss of heterozygosity, gene inactivation by methylation and gene amplification. Different studies have revealed numerous molecular abnormalities in HNSCC, including activation of oncogenes such as *EGFR*, *cyclin D1* and *COX-2*; inactivation of tumor suppressor genes such as *TP53*, *p16*, *p27*, and *WAF1/CIP1*; and expression of angiogenic and metastatic factors, as well as genetic polymorphisms of metabolic enzymes. This review presents current information about the main genetic changes involved in the development of head and neck cancer, which shows potential prognostic value and discusses some factors that contribute to the controversy concerning their prognostic importance.

**Key words:** Head and neck cancer; Multistep carcinogenesis; Genetic alterations; Oncogene; Tumor suppressor gene; Polymorphisms