

MÁRCIA HATAKEYAMA

**EXPRESSÃO DE HER-1 E HER-2 TOTAIS E
FOSFORILADOS EM QUEILITE ACTÍNICA E
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO INFERIOR**



2010

MÁRCIA HATAKEYAMA

**EXPRESSÃO DE HER-1 E HER-2 TOTAIS E FOSFORILADOS
EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE
DE LÁBIO INFERIOR**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia

Orientadora: Prof^a. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante

São José dos Campos

2010

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia
prático para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC.
São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2008

H28e Hatakeyama, Márcia.

Expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados em queilite
actínica e carcinoma epidermóide de lábio inferior / Márcia
Hatakeyama. __ São José dos Campos: [s.n.], 2010
146 f.: il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia
de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2010.
Orientador: Prof. Dr. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante

1.HER . 2.Imunoistoquímica. 3.Queilite. 4.Carcinoma. 5. Lábio. I.
Cavalcante, Ana Sueli Rodrigues. II. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD79

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e
Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a
fonte.

São José dos Campos, 30 de junho de 2010.

Assinatura:

E-mail: marciah23@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante (ORIENTADORA)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Dra. Adriana Aigotti H. Brandão

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Dra. Marília T. Martins

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. Fábio L. Forti

Instituto de Química
Universidade de São Paulo – USP

São José dos Campos, 30 de junho de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Kazuto** e **Mitsuko**, apesar da distância sempre presentes, dando incentivo e apoiando minha caminhada em todos esses anos. Muito obrigada por tornar realidade os meus ensejos profissionais.

Aos meus irmãos, **Marcus Rogério** e **Renato**, pelo exemplo de pessoas e profissionais a serem seguidos.

Ao meu namorado, **Marcelo** pelo companheirismo, paciência e ajuda em vários momentos, tornando os momentos mais leves.

Aos meus tios, **Fugio** e **Isabel**, por ter me acolhido em sua moradia e cuidados dedicados a mim.

Aos meus **Antepassados**, pela orientação, proteção, força espiritual e fonte inspiradora na superação de barreiras e obstáculos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela serenidade e iluminação dada em muitos momentos necessários para prosseguir em minha caminhada e concluir esta pesquisa.

À direção da Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", pelo apoio as iniciativas na melhoria do ensino de Graduação e Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, por proporcionar o aprendizado e a obtenção do título de doutorado.

À coordenadora de Pós-graduação, Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito, pelo exemplo de comprometimento e competência no que se propõe a realizar;

À minha orientadora, Profa. Adj. Ana Sueli R. Carvalcante, pela orientação deste trabalho, sempre em busca de desafios e novos conhecimentos.

Agradeço pela compreensão e auxílio nestes anos de convívio.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Suzanne Eccles, por ter me aceito e recebido em seu grupo. Ainda ter aumentado minha visibilidade pessoal e profissional. Exemplo de pesquisadora a ser seguido demonstrando muito profissionalismo em todos os momentos.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação, pelo ensino proporcionado dentro e fora de sala de aula.

Aos professores da Disciplina de Patologia, Profa. Tit. Yasmin R. Carvalho e Prof. Adj. Luiz E. B. Rosa, por seus ensinamentos. Em especial a Profa. Tit. Yasmin R. Carvalho pela competência em que conduz a área de concentração de Biopatologia Bucal.

À Profa. Dra. Adriana A. H. Brandão, por muita sabedoria passada a mim em vários momentos e com uma didática exemplar.

Aos professores da Disciplina de Propedêutica Estomatológica, Profa. Adj. Janete D. Almeida, Prof. Adj. Walter D. Nicoli Filho, Prof. Adj. Luiz A. G. Cabral, pelo convívio e aprendizagem.

À patologista, Profa. Adj. Mônica F. Gomes, sempre prestativa em querer ajudar no que era possível.

À patologista Profa. Dra. Suzana C. Orsini Machado de Sousa, por sua solicitude e em disponibilizar o laboratório da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSSP

Aos patologistas, Dr. George Thomas, Dr. Marcos Corpa, Dr. Rafael M. Rocha, Dra. Kátia Ramos M. Leite pelo auxílio no esclarecimento de dúvidas referentes à interpretação da expressão das proteínas estudadas.

À patologista, Profa. Dra. Marília Frierweiler Martins, pela colaboração e solicitude na finalização desta pesquisa.

Ao químico, Prof. Dr. Fábio Luís Forti, pelos ensinamentos relativos à biologia molecular nas etapas finais.

À bióloga, Profa. Adj. Silvia R. Rogatto, pela sua disponibilidade e sugestões para a melhoria deste trabalho.

Ao estatístico, Prof. Dr. Ivan Balducci, pela cooperação no entendimento da análise estatística.

Às pos-doutorandas, Susanne Rogers, Carol Box e Lenaic Paon pela ajuda na condução deste trabalho e companhia.

Ao ``Tumour and Biology and Metastasis Team`` pela ajuda na adaptação no laboratório e em algumas fases imprescindíveis da minha pesquisa.

Às técnicas, Elisa dos Santos e Ruth Riisnaes, pela ajuda através de suas experiências laboratoriais e pela paciência.

Aos técnicos, Salete e Valler, pela confecção das lâminas deste trabalho.

À estagiária, Thaís, pela amizade e por ser prestativa sempre.

Às funcionárias da secretaria da Pós-graduação, Rose, Erena e Cidinha, por auxiliar no cumprimento de nossos deveres perante o curso de Pós-graduação.

Aos funcionários do Setor de Importação da UNESP, que cooperaram direta ou indiretamente no desembaraço no recebimento dos reagentes desta pesquisa.

Às funcionárias da Biblioteca, especialmente a Silvana Alvarez, pela revisão deste trabalho.

Aos funcionários do Suporte audiovisual, principalmente ao Luciano M. Lima e Carlos E. de Oliveira pela ajuda relacionada à área de informática.

Ao funcionário, Ivan, pelos cuidados aos nossos pacientes atendidos no ambulatório da Propedêutica.

Às amigas de Pós-graduação, Nívea, Ana Paula, Gisele e Juliana pela companhia e amizade.

Aos colegas da Pós-graduação da UNESP e USP, pelos momentos de descontração diante dos deveres a serem cumpridos.

Às amigas Ana Luisa, Mariana, Vera, Luciana, Rita Sayoko pela amizade verdadeira e ajuda em vários momentos.

Aos pacientes do ambulatório de Propedêutica Estomatológica, por tornar possível esta pesquisa.

À CAPES, por conceder a bolsa de estudo.

A todos que contribuíram na execução deste trabalho que jamais serão esquecidos, pois a conclusão desta pesquisa foi fruto da colaboração de todos em alguma fase.

*“Por piores que sejam as dificuldades, saiba que você tem a força necessária
para superá-las e a coragem de caminhar através do seu calvário. Isso é
parte da conquista da maturidade”*

Roberto Shinyashiki

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
LISTA DE FIGURAS.....	16
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	22
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1 Radiação ultravioleta.....	28
2.2 Queilite actínica.....	31
2.2.1 Outros fatores etiológicos.....	31
2.2.2 Características clínicas.....	32
2.2.3 Diagnóstico diferencial.....	33
2.2.4 Características histopatológicas	34
2.2.5 Tratamento e prognóstico.....	35
2.3 Carcinoma Epidermóide de lábio.....	38
2.3.1 Outros fatores etiológicos.....	39
2.3.2 Características clínicas.....	40
2.3.3 Diagnóstico diferencial.....	41
2.3.4 Características histopatológicas.....	42
2.3.5 Tratamento e prognóstico.....	43
2.4 Família HER.....	45
2.4.1 Receptores e ligantes da família HER.....	45

2.4.2 Vias de sinalização da família HER.....	49
2.4.3 Interação entre as vias de sinalização induzida pela radiação UV e família HER.....	53
2.4.4 Papel da família HER no câncer.....	54
2.4.5 Expressão da família HER em cânceres humanos/Prognóstico.....	56
2.4.6 Expressão da família HER em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço / Prognóstico.....	59
2.4.7 Fármacos.....	62
3 PROPOSIÇÃO.....	65
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	66
4.1 Amostra.....	66
4.2 Procedimento ambulatorial.....	66
4.3 Procedimento laboratorial.....	68
4.3.1 Cultura de células.....	72
4.3.2 Xenoenxertia.....	73
4.3.3 Otimização da técnica imunoistoquímica.....	74
4.3.4 Imunoistoquímica.....	74
4.4 Interpretação da marcação imunoistoquímica.....	78
4.4.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	79
4.5 Análise estatística.....	80
4.5.1 Análise dos dados.....	80
5 RESULTADOS.....	81
5.1 Perfil da Amostra.....	81
5.2 Expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas	

celulares.....	82
5.3 Comparação da expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos de acordo com as estruturas celulares.....	86
5.4 Correlação da expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos de acordo com as estruturas celulares.....	88
5.4.1 Correlação da expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos na membrana.....	89
5.4.2 Correlação da expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos no citoplasma.....	89
5.4.3 Correlação da expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos no núcleo.....	90
5.5 Discrepâncias entre a expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos de acordo com a estrutura celular.....	91
5.6 Análise descritiva.....	92
6 DISCUSSÃO.....	97
7 CONCLUSÃO.....	112
8 REFERÊNCIAS.....	114
APÊNDICE.....	135
ANEXOS.....	144
ABSTRACT.....	146

Hatakeyama M. Expressão de HER-1, HER-2 totais e fosforilados em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio inferior [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2010.

RESUMO

A queilite actínica (QA) é uma lesão multifocal que acomete o vermelhão do lábio com potencial de malignização para carcinoma epidermóide (CE). O receptor para o fator de crescimento epidermal (EGFR) é membro da família dos receptores tirosina quinase que participa da transformação e progressão da neoplasia maligna. O objetivo desta pesquisa foi verificar a expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados e possíveis correlações das expressões destas proteínas com lesões de QA e CE de lábio inferior por imunoistoquímica. Foram um estudo de 50 casos de QA, 50 casos de CE e 14 de Controle. Expressão das proteínas foi baseado num escore. Os dados obtidos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e como análise *post-hoc* o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni e, correlação de Spearman. O nível de significância escolhido foi o valor convencional de 5%. A análise da comparação foi estatisticamente significativa na membrana do pHER-2, grupos Controle x QA e QA x CE; no citoplasma do HER-1, grupos Controle x QA, do pHER-1, grupos Controle x QA e Controle x CE, do pHER-2, grupos Controle x QA e Controle x CE; no núcleo do pHER-1, grupos Controle x QA, do HER-2, Controle x QA e Controle x CE ($p < 0,05$). O estudo da correlação foi estatisticamente significativa na membrana do HER-1 x pHER-2 no grupo QA, HER-1 x HER-2, HER-1 x pHER-1, HER-2 x pHER-1 no grupo CE; no citoplasma entre HER-1 x HER-2 no grupo QA, HER-1 x HER-2 no grupo CE; no núcleo entre HER-2 x pHER-1 no grupo Controle ($p < 0,05$). Estes dados sugerem que a maior marcação no grupo Controle poderia ser

decorrente da variedade de lesões benignas que compõem esse grupo e que poderiam apresentar proliferação aumentada. Localização nuclear poderia estar relacionada não apenas como iniciadores das cascatas intracelulares, mas também como fatores de transcrição. A fosforilação dos receptores HER-1 e HER-2 desencadeando a via da MAPK pode ser independente dos níveis totais das proteínas em lesões de QA e CE labial, já que a fosforilação pode estar aumentada indiretamente devido a radiação UV de uma forma independente de ligantes.

Palavras-chave: HER. Imunoistoquímica. Queilite. Carcinoma. Lábio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação esquemática da estrutura dos receptores da família HER: domínio extracelular, região transmembrana e domínio intracelular.....	46
Figura 2-	Cascata de sinalização da família HER.....	51
Figura 3A-	Aspecto multifocal da QA em lábio inferior.....	68
Figura 3B-	Vermelhão do lábio comprometido por lesões de QA e CE	68
Figura 4A-	Fotomicrografia de lesão de QA mostrando atipia epitelial com hiperortoqueratose e degeneração basofílica no tecido conjuntivo. (HE. Aumento original 200X).....	71
Figura 4B-	Fotomicrografia de CE mostrando hipercromatismo, pleomorfismo celular e nuclear no carcinoma epidermóide de lábio. (HE. Aumento original 400X)...	71

Figura 5A-	Incubadora a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO ₂ e 95% de O ₂	73
Figura 5B-	Frascos de plásticos contendo DMEM com 10% de FCS.....	73
Figura 6 -	Controles positivos: A) e B) HER-1 (CAL27); C) e D) pHER-1 (CAL27); E) e F) HER-2 (HN4); G) e H) pHER-2 (HN4). Controles negativos: I) CAL27; J) HN4. (A; C; E; G. Aumento original 200X). (B; D; F; H; I; J. Aumento original 400X).....	77
Figura 7 -	Distribuição relativa (%) dos níveis de expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados que apresentaram diferença estatística significativa de acordo com a estrutura celular nos grupos Controle, QA e CE	88
Figura 8 -	Fotomicrografia com marcação imunoistoquímica da membrana e citoplasma pelo HER-1. Maior intensidade da expressão na camada basal do que nas outras camadas (Aumento original 200X).....	93
Figura 9 -	Marcação imunoistoquímica representativa para HER-1, pHER-1, HER-2 e pHER-2 no grupo Controle. A) e B): expressão de HER-1 na	

membrana e citoplasma; C) e D): expressão de pHER-1 no citoplasma e núcleo; E) e F): expressão de HER-2 no citoplasma e núcleo; G) e H): ausência de expressão de pHER-2. (A; C; E; G: Aumento original 200X). (B; D; F; H: Aumento original 400X)..... 94

Figura 10 - Marcação imunoistoquímica representativa para HER-1, pHER-1, HER-2 e pHER-2 no grupo QA. A) e B): expressão de HER-1 na membrana e citoplasma; C) e D): expressão de pHER-1 na membrana; E) e F): expressão de HER-2 no citoplasma; G) e H): expressão de pHER-2 no citoplasma. (A; C; E; G: Aumento original 200X). (B; D; F; H: Aumento original 400X)..... 95

Figura 11 - Marcação imunoistoquímica representativa para HER-1, pHER-1, HER-2 e pHER-2 no grupo CE. A) e B): expressão de HER-1 na membrana e citoplasma; C) e D): ausência de expressão de pHER-1; E) e F): expressão de HER-2 na membrana e no citoplasma; G) e H): ausência de expressão de pHER-2. (A; C; E; G: Aumento original 200X). (B; D; F; H: Aumento original 400X)..... 96

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Especificidade da ligação de ligantes para receptores da família HER.....	49
Quadro 2 -	Resumo dos anticorpos, métodos utilizados e controles positivos.....	76
Tabela 1 -	Distribuição relativa (%) da expressão de HER-1 nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares.....	83
Tabela 2 -	Distribuição relativa (%) dos níveis de expressão de HER-1, pHER-1, HER-2 e pHER-2 nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares.....	139
Tabela 3 -	Distribuição relativa (%) dos níveis de expressão de pHER-1 nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares.....	84
Tabela 4 -	Distribuição relativa (%) da expressão de HER-2 nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares (conclusão).....	85

Tabela 5 -	Distribuição relativa (%) dos níveis de expressão de pHER-2 nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares.....	86
Tabela 6 -	Valores de mediana, Q1 e Q3 de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados de acordo com a estrutura celular nos grupos Controle, QA e CE.....	141
Tabela 7 -	Resultado do teste de Kruskal-Wallis (p-valor) em relação aos níveis de expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados de acordo com a localização na membrana, citoplasma e núcleo entre os grupos Controle, QA e CE.....	142
Tabela 8 -	Resultado do teste de Mann-Whitney (p-valor) em relação aos níveis de expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados de acordo com a localização na membrana, citoplasma e núcleo entre pares de grupos.....	142
Tabela 9 -	Resultado da correlação de Spearman (p-valor) entre HER-1 e HER-2 totais e fosforilados nos grupos Controle, QA e CE.....	143
Tabela 10 -	Resultado da correlação de Spearman (p-valor) entre HER-1 e HER-2 totais e fosforilados que	

apresentaram correlação estatisticamente
significante de acordo com a localização na
membrana, citoplasma e núcleo nos grupos
Controle, QA e CE..... 90

Tabela 11 - Discrepâncias entre HER-1 e HER-2 totais e
fosforilados nos grupos Controle, QA e CE..... 91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1 = proteína ativadora 1

AR= anfiregulina

ATP = trifosfato de adenosina

BTC = betacelulina

CE = carcinoma epidermóide

CO₂ = gás carbônico

DAB = diaminobenzidina

DMEM = meio Dulbecco modificado por Eagle

DNA = ácido desorribonucléico

DNAmt = ácido desorribonucléico mitocondrial

EGF = fator de crescimento epidermal

EGFR = receptor para o fator de crescimento epidermal

Egr-1 = fator de resposta de crescimento precoce 1

EPR= epiregulina

ErbB = receptor de fator de crescimento epidermal

Ets = E-26

FCS = soro bovino fetal

FPS= fotoprotetores solares

GPCR= receptor acoplado a proteína G

Hb = heparina

HE = hematoxilina e eosina

HER = receptor de fator de crescimento epidermal

IL = interleucina

kDa = quilodaltons

MAPK = MAP quinase

MMPs = metaloproteases

μm = micrômetro

NRG = neuregulina

NF-kB = fator nuclear Kappa B

OMS = Organização Mundial de Saúde

PABA: para-aminobenzóico

PBS = tampão fosfato salina

PCNA = antígeno nuclear de proliferação celular

pH = potencial hidrogeniônico

PI3K = fosfatidilinositol 3-quinase

QA = queilite actínica

RNA = ácido ribonucléico

ROI = intermediários reativos de oxigênio

ROS = espécies reativas de oxigênio

SKC = família Src quinase

TGF = fator de crescimento de transformação

TNF-α = fator de necrose tumoral-alfa

UCA = ácido urocânico

UV = ultravioleta

VEGF = fator de crescimento endotelial vascular

Yag = *yttrium aluminium garnet*

1 INTRODUÇÃO

Queilite actínica (QA) é decorrente do dano actínico no lábio, que se caracteriza por alterações clínicas e histológicas (Cavalcante et al., 2000; Marcopoulos et al, 2004; Nico et al., 2007).

Foi descrita pela primeira vez por Ayres, 1923 ao relatar 5 casos de lesões labiais caracterizadas por uma alteração inflamatória crônica, preferencialmente do lábio inferior provocada pela radiação solar ou agentes químicos, sendo denominados de QA crônica ou queilite esfoliativa.

A radiação solar desencadeia mutação do gene p53, consequentemente iniciação tumoral (mutação do DNA), sendo que o dano do DNA ou fotoisomerização de trans para cis-ácido urocânico (UCA) desencadeia vários eventos, incluindo a imunossupressão que tem relação direta na carcinogênese (Clydesdale et al., 2001).

A QA é uma lesão potencialmente cancerizável, por ter maior probabilidade de evoluir para um câncer, apesar de que nem toda lesão necessariamente se transforma em uma neoplasia maligna (Brasileiro Filho et al., 1998).

A probabilidade da evolução de QA para carcinoma epidermóide (CE) não é determinada. Acredita-se que o dano solar é cumulativo, e que a exposição contínua sem proteção para levar ao

desenvolvimento de CE é só uma questão de tempo (Main; Pavone, 1994).

O CE é uma neoplasia epitelial invasiva com vários graus de diferenciação escamosa, com propensão à metástase precoce e comprometimento dos linfonodos (Johnson et al., 2005).

Quanto à incidência de todas as neoplasias malignas, os CE orais e de orofaringe representam cerca de 90%. No mundo 389.650 casos de CE ocorreram no ano de 2000, destes 266.672 em cavidade bucal e 122.978 na orofaringe. Isto representa 4 a 5% de todos os cânceres em homens e 2% em mulheres. A relação atual de homem/mulher é de aproximadamente 2:1, e tem sido relacionada com o aumento do número de mulheres fumantes e com sua probabilidade de vida mais longa (Bork et al., 1993; Regezi; Sciubba, 2000; Johnson et al., 2005). No Brasil as estimativas para o ano de 2010 e 2011 indicam a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer, sendo a região sul e sudeste as que apresentam as maiores taxas. Na cavidade oral serão 14.120 novos casos em 2010 (INCA, 2009).

Os carcinomas de lábio representam 25 a 30% de todos os cânceres orais (Bork et al., 1993; Regezi; Sciubba, 2000), são predominantemente CE (Main; Pavone, 1994), a maioria surge no vermelhão (Moore et al., 1999) e envolvem com frequência destacada o lábio inferior (Ibsen; Phelan, 1996; Neville et al., 1998). O carcinoma do vermelhão de lábio tem uma fisiopatologia que se assemelha mais com a do CE da pele exposta ao sol do que a do carcinoma intra-oral (Neville et al., 2004).

O aumento da incidência de câncer humano, terapias convencionais limitadas e prognóstico desfavorável levaram a área científica e médica em busca de novas abordagens a serem empregadas isoladamente ou em combinação com as já existentes. Algumas moléculas que participam de processos fisiológicos em nosso organismo também têm sido associadas à transformação oncogênica *in vitro* e *in vivo*, entre eles os receptores da família tirosina quinase: HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4 (Olayioye et al., 2000). Estes receptores têm sido relacionados a carcinomas de mama (Slamon et al., 1989; Stern, 2003; Wiseman et al., 2005), ovário (Slamon et al., 1989), pancreático (Safran et al., 2001), gástrico (Lemoine et al., 1991) e cabeça e pescoço (Shin et al., 1994; Grandis et al., 1996). Logo, inibição desses receptores surgiria como uma alternativa no tratamento das neoplasias que a superexpressam.

Além da análise dos receptores nas formas totais há também nas formas fosforiladas, devido a sua importância na ativação da cascata intracelular (El Sheikh et al., 2004; Nieto et al., 2007; Taniyama et al., 2008; Magkou et al., 2008; Frogne et al., 2009), gerando respostas celulares, tendo assim um maior significado biológico.

Na literatura não há estudos sobre a expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados em QA e há poucos estudos em CE da região de cabeça e pescoço. O conhecimento da expressão da família HER pode contribuir para o entendimento da patogênese da QA e do CE, mecanismo da possível progressão da QA para o CE e evolução do CE. Ainda pode auxiliar no diagnóstico precoce em lesões

incipientes não perceptíveis clinicamente que já podem apresentar alterações a nível molecular e genético. Consequentemente, irá favorecer o prognóstico e tornar os tratamentos mais efetivos com o bloqueio de moléculas envolvidas no surgimento e progressão da neoplasia. O objetivo deste trabalho foi verificar a expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados e possíveis correlações das expressões destas proteínas com lesões de QA e CE de lábio inferior por imunoistoquímica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Radiação Ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) compreende uma faixa de energia de 200nm a 400nm. O espectro eletromagnético solar pode ser dividido em UVC (200 – 280 nm), UVB (280 - 315 nm) e UVA (315 – 400 nm). A radiação UVC não é relevante na carcinogênese humana, porque é atenuada pela atmosfera. A UVB é muito mais mutagênica que UVA, sendo considerado comprimento de onda responsável pela ensolação, envelhecimento da pele e indução de câncer de pele. UVA corresponde a 90% do espectro eletromagnético solar e é menos ativa biologicamente que UVB (Quinn, 1997).

A radiação UV exerce efeitos mutagênicos no ácido desoxirribonucleico (DNA) (Berneburg et al., 2000), inflamação, eritema (Melnikova; Ananthaswamy, 2005), imunossupressão (Hart et al., 2001; Berking et al., 2002) e câncer de pele (Melnikova; Ananthaswamy, 2005).

Ao penetrar na pele ela interage com diferentes células que estão localizadas em profundidades diferentes na dependência do seu comprimento de onda. A luz UV de comprimento de onda curta

(UVB 280 – 320 nm) absorvido em maior parte na epiderme afeta predominantemente as células epidermais, isto é, os queratinócitos, enquanto que a onda de maior comprimento (UVA 320-400 nm) penetra mais profundamente e pode interagir com os queratinócitos e os fibroblastos. A UVA age indiretamente pela geração de radicais livres, que podem exercer efeitos como peroxidação lipídica, ativação de fatores de transcrição (proteína ativadora (AP-1) e fator nuclear (NF-kB)), e mutação do ácido desorribonucléico mitocondrial (DNAm_t). Embora a UVB também possa gerar radicais livres, seu principal mecanismo de ação é a interação direta com o DNA, danificando-o. Os danos no DNAm_t causam doenças degenerativas, além de estar envolvido no processo de envelhecimento (Berneburg et al., 2000).

A radiação UV também causa uma resposta inflamatória inicial através de vasodilatação resultando em eritema, devido à ação de várias substâncias, como o aumento de óxido nítrico, histamina e prostaglandina-2, e produção de citocinas como interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), IL-6 e IL-8. Consequentemente, levando a produção de mediadores: fator de crescimento de transformação-beta (TGF- β), IL-10 e IL-1RA como também neuropeptídeos, citocinas, fatores de crescimento. A resposta imune é afetada por alterar moléculas de adesão e expressão das citocinas (Clydesdale et al., 2001). Elastase e outras proteases como a catepsina G liberadas dos neutrófilos causam inflamação e ativação de várias metaloproteases. Estas reações levam à degradação da matriz extracelular e acúmulo de componentes não funcionais da

matriz. A inflamação e espécies reativas de oxigênio (ROS) causam dano oxidativo às proteínas celulares, lipídeos e carboidratos, que se acumulam na derme e epiderme, ocorrendo assim o envelhecimento (Pillai et al., 2005).

Durante a radiação UV aguda ocorre reparo do DNA danificado, apoptose envolvendo p53 e a ligação do receptor FAS (APO-1/CD95) e seu ligante (FASL) (Melnikova; Ananthaswamy, 2005), enquanto na exposição crônica ocorrem mutações do gene p53, alterações nas interações de FAS-FASL contribuindo para a fase inicial do desenvolvimento de câncer, ou seja, tanto a mutação do p53 quanto a perda da expressão de FASL podem levar a inibição do apoptose, a proliferação de queratinócitos com DNA danificados até a progressão do câncer de pele (Ouhtit et al., 2000). A radiação ativa vias pro e anti-apoptóticas (Wang et al., 2003). Em contrapartida, a radiação também estimula mecanismos de sobrevivência e proliferação celular (Melnikova; Ananthaswamy, 2005).

A cascata de sinalização oriunda da radiação UV depende do dano do DNA e provavelmente inicia-se pela ativação de receptores de fatores de crescimento ou de outros componentes associados às tirosinas quinases. Estes levam à ativação de src, ras e raf e em sequência a ativação de fatores de transcrição, que controlam a atividade dos genes. Assim, levando ao aumento da expressão gênica em resposta a radiação UV (Sachsenmaier et al., 1994).

2.2 Queilite Actínica

A QA é uma condição degenerativa que afeta o lábio com potencial de transformação maligna (Main; Pavone, 1994; Bentley et al., 2003).

A palavra actínica está relacionada aos raios quimicamente ativos do espectro eletromagnético e a palavra queilite refere-se ao processo inflamatório da mucosa labial (Galvão-Filho, 1998).

2.2.1 Outros fatores etiológicos

Outros fatores etiológicos, além da exposição à radiação UV, têm sido implicados com o risco para a QA, tais como: alguns hábitos alimentares (Lindqvist, 1979), fumo, condições sócio-econômicas (Lindqvist, 1979; Manganaro et al., 1997), processos químicos, infecção viral, sífilis, dentição precária (Manganaro et al., 1997) e predisposição genética (Douglass; Gammon, 1984).

Exposição ao fumo, poluentes e o processo natural de envelhecimento da pele contribuem para a formação de radicais livres que estimulam o processo inflamatório na pele. Um dos primeiros eventos é a ativação de fatores de transcrição que regulam a

degradação proteolítica da matriz extracelular da pele. Estudo em pele envelhecida demonstrou aumento da ativação proteolítica e uma alteração na matriz extracelular, levando a um aumento na degradação do colágeno e nas fibras elásticas na derme, resultando em perda da elasticidade da pele (Pillai et al., 2005).

2.2.2 Características clínicas

A QA ocorre em indivíduos acima dos 45 anos de idade, leucodermas, com predileção pelo gênero masculino, numa proporção de 10:1 (Neville et al., 1998). Isto se deve provavelmente ao fato de que os homens têm atuação profissional mais relacionada a ambientes externos e a mulher faz uso de batom que exerce um efeito protetor (Main; Pavone, 1994). O lábio inferior é mais severamente envolvido que o lábio superior (Main; Pavone, 1994; Ibsen; Phelan, 1996) por estar mais exposto à radiação UV, devido a protusão e estar orientado para cima (Scheinberg, 1992). As regiões mediana e paramediana são mais afetadas que as comissuras (Robinson, 1989).

Clinicamente, nos estágios iniciais sem quadro agudo a QA passa despercebida. Com a evolução, o vermelhão do lábio passa a ter um aspecto multifocal com a presença de manchas ou placas brancas, áreas atróficas eritematosas e/ou pálidas, aumento de volume (infiltração), perda da definição da linha divisória entre a pele e o vermelhão, enrugamento, descamação, sintomatologia de

ressecamento e ardor. Há outros aspectos referidos na literatura, como o quadro agudo de QA com edema e eritema, úlceras com cicatrização lenta (Main; Pavone, 1994; Laskaris, 2004), atrofia e perda de elasticidade (Bentley et al., 2003). É também descrita tratar-se de uma condição difusa e discreta (Robinson, 1989), que tende a cicatrizar quando tem úlceras, mas seu aspecto não desaparece completamente (Girard et al., 1980).

Não se sabe ainda o porquê da queilite actínica crônica ser precedida por quadros agudos, no entanto é um evento comum relatado pela maioria dos pacientes com a condição crônica (Main; Pavone, 1994).

2.2.3 Diagnóstico diferencial

Considera-se no diagnóstico diferencial da QA outras lesões como: líquen plano, lúpus eritematoso (Picascia; Robinson, 1987; Scheinberg, 1992; Laskaris, 2004), queilite por contato, CE (Scheinberg, 1992; Laskaris, 2004), dano por tratamento por radiação (Picascia; Robinson, 1987). No líquen plano de lábio, a hiperqueratose é na maioria das vezes reticulada e pode haver a presença de lesão intra-oral. O lúpus eritematoso pode-se apresentar no lábio, mas haverá outras lesões na pele ou cabeça (Main; Pavone, 1994). Geralmente, se for uma lesão proveniente de irritação por contato envolverá ambos os lábios. Pode-se realizar um teste de

sensibilidade e irá curar após a remoção do agente causador e uso de um corticóide tópico. A lesão oriunda da radioterapia pode ser esclarecida através da história, exame físico e quando necessária a realização de biópsia (Picascia; Robinson, 1987).

Brightman (1994) observou que a distinção da QA deve ser realizada com ceratose senil / elastose. Ainda citou a leucoplasia no diagnóstico diferencial. Segundo o autor, clinicamente é difícil verificar a presença de alterações displásicas, sendo indicada a biópsia nas lesões que não regredem com orientação e utilização de fotoprotetores solares (FPS).

O diagnóstico diferencial para úlceras que não cicatrizam no vermelhão do lábio incluem ceratoacantoma, CE, infecção fúngica profunda e tuberculose (Manganaro et al., 1997).

2.2.4 Características histopatológicas

Microscopicamente, no epitélio ocorre uma hiperkeratose (orto ou para), atrofia ou hiperplasia epitelial e acantose (Stanley; Roenigk, 1988; Main; Pavone, 1994; Kaugars et al., 1999). O epitélio escamoso devido à radiação UV pode mostrar uma maturação desordenada, com vários graus de queratinização, pleomorfismo celular e aumento da atividade mitótica em estágios mais tardios, nestes casos a atipia está presente de forma leve, moderada ou grave. A relação entre atipia epitelial em seus vários

graus e o desenvolvimento para carcinoma ainda não está bem esclarecido. Qualquer grau de atipia epitelial, mesmo o discreto, é um sinal do potencial de malignização da lesão, mas a atipia grave indica um risco maior de desenvolvimento em carcinoma (Pindborg, 1997).

Na lâmina própria há a presença de degeneração basofílica e na maioria dos casos inflamação (Lundeen et al., 1985; Kaugars et al., 1999), sendo que vasos telangiectásicos também são notados (Regezi; Sciubba, 2000). Essa alteração degenerativa (degeneração basofílica) demonstra desintegração das fibras colágenas e formação de massas de material basofílico na lâmina própria, sendo irreversível. A produção de material anormal decorrente da degeneração basofílica evolui para a formação da área espessada que se mostra na pele abaixo do vermelhão caracterizando a QA (Main; Pavone, 1994). QA com um infiltrado inflamatório pronunciado pode ter CE invasivo próximo à área de biópsia, enfatizando uma maior cautela nestes casos (Pimentel et al., 2006).

2.2.5 Tratamento e Prognóstico

Quando a QA é diagnosticada clinicamente, a primeira conduta do profissional deve ser explicar ao paciente quanto ao potencial de malignização dessa lesão e enfatizar a natureza progressiva e lenta da mesma (Main; Pavone, 1994). Deve-se expor também a importância da realização da biópsia para definir o

diagnóstico final de QA que ainda vem acrescido de informações sobre a presença ou ausência de atipia. O tratamento consiste na utilização de FPS, a fim de se prevenir a progressão do dano actínico. A seleção do FPS inclui o fator de proteção, absorção, substantividade, potencial de sensibilização, aceitação cosmética e custo. A melhor formulação é uma combinação de ácido para-aminobenzóico (PABA) ou um éster de PABA junto com um benzofenol, devendo ser reaplicados de uma em uma hora (Lundeen et al., 1985).

Nos estágios iniciais a biópsia pode ser indicada. Manganaro et al. (1997) indicaram a realização de biópsia na fase precoce da QA, porque para eles não há correlação entre a aparência clínica e a histomorfológica da lesão. Especialmente as áreas endurecidas, espessas, com ulceração ou lesões brancas devem ser submetidas à biópsia, para eliminar a possibilidade de CE (Main; Pavone, 1994). Todos os casos de QA devem ser acompanhados clinicamente.

Nico et al. (2007) ao realizarem a biópsia de lábio inferior em 20 pacientes com diagnóstico clínico de QA com lesões difusas, notaram alterações histológicas heterogêneas mesmo nos casos com aspecto homogêneo clinicamente.

Outros tipos de abordagem são citadas como criocirurgia, 5-fluorouracil, *peeling* químico, laser com dióxido de carbono, eletrodissecção (Laws et al., 2000), terapia fotodinâmica, imiquimoid tópico a 5% (Smith et al., 2002), gel de diclofenaco a 3%

(Ulrich et al., 2007) e *Yttrium aluminium garnet* (YAG) laser (Orenstein et al., 2007).

De acordo com Scheinberg (1992), o tratamento com laser de dióxido de carbono remove o epitélio com menos morbidade e menos recorrência que outras técnicas, tais como: nitrogênio líquido, fluorouracil, tretinoína (retin-A) e vermelhectomia. Esse método é eficiente, o trans-cirúrgico não sangra, a sintomatologia é mínima no pós-operatório, a cicatrização é discreta e há poucas complicações. A biópsia incisional deve ser realizada antes da terapia com laser para descartar CE em áreas ulceradas ou endurecidas.

Segundo Smith et al. (2002), imiquimoid tópico a 5% tem a vantagem de não levar à destruição não seletiva que ocorre com a crioterapia, eletrodissecção ou terapia com laser. Esse procedimento age aumentando a resposta adaptativa cutânea e a resposta imune inata por efeito antiviral e antineoplásico. No entanto, a sua eficácia em longo prazo ainda não está determinada, tendo mais efeitos em clarear as manchas causadas pela radiação solar.

A terapia fotodinâmica tem sido utilizada amplamente para o tratamento de ceratose actínica e carcinoma de células basais. Tem como vantagens não ser uma técnica invasiva, não sangrar, apresentar possibilidade de tratar áreas extensas ao mesmo tempo, ser bem tolerada e efetiva, não necessitar de hospitalização do paciente e apresentar resultados estéticos sem formação de cicatriz (Berking et al., 2007).

Uma nova modalidade de tratamento para QA é o YAG laser, apresentando remoção precisa do tecido, resultado

estético satisfatório, com período de cicatrização curto, sem deformidade labial, sem perda de sensibilidade, sem sinais de recorrência e nem complicações pós-operatórias (Orenstein et al., 2007).

Em relação à probabilidade de transformação de QA para CE não há estatística ainda confiável. Eisen e Lynch (1993) relataram essa ocorrência acima de 10% dos casos. Marcopoulos et al. (2004) encontraram 16,9% de casos de QA que desenvolveram CE, porém admitiram em seu próprio estudo que essa porcentagem poderia não refletir um índice verdadeiro de transformação maligna.

2.3 Carcinoma Epidermóide de lábio

Em lábios afetados pela QA, diferentes estágios da displasia e do CE *in situ* podem estar presentes simultaneamente em diferentes localizações, sendo que alterações como áreas endurecidas, úlceras que não cicatrizam, áreas de eritema persistente e sinais localizados de aumento de hiperqueratose podem ser considerados como indicadores de possível transformação maligna (Main; Pavone, 1994).

2.3.1 Outros fatores etiológicos

A etiologia do CE oral é multifatorial. São listados como fatores extrínsecos: o fumo de tabaco, álcool, radiação solar (nos casos do CE de lábio), atividade profissional e condição sócio-econômica. Os fatores intrínsecos incluem condições sistêmicas (por exemplo, anemia por deficiência de ferro), dieta, nutrição, condição de higiene oral, infecção viral (Epstein-Barr, citomegalovírus, herpes e papilomavírus), estado imunológico e susceptibilidade genética. A radiação UV é o fator de maior importância na etiologia de CE de lábio (Main; Pavone, 1994; Eisen; Lynch, 1998; Neville et al., 1998; Visscher et al., 1998), sendo que 70 % dos indivíduos afetados trabalham ao ar livre (Neville et al., 2004). O CE de lábio desenvolve-se em quase todos os casos com QA pré-existente. Fatores etiológicos específicos são difíceis de se isolar e os pesquisadores preferem listar os fatores de risco que contribuem para o processo de carcinogênese (Moore et al., 1999). E como resultado de uma exposição prolongada e repetida a estes fatores de risco, pode-se levar a uma eventual progressão ao CE invasivo (Visscher et al., 1998). O risco acumulado durante a vida para desenvolver o câncer de lábio é de 0,15% para os homens e 0,07% para as mulheres (Neville et al., 2004).

2.3.2 Características clínicas

A razão homem-mulher é de 2:1 e o pico da incidência ocorre nas décadas de 60 e 70 anos de idade (Bork et al., 1993). Fernández-Ángel et al. (2003) ao realizar em um estudo retrospectivo com 251 pacientes com diagnóstico de CE de lábio inferior encontraram como média de idade do diagnóstico dessa neoplasia 73,75 anos para mulheres e 62,16 anos para homens. A idade mostrou ser significativamente mais alta para mulheres, sendo o diagnóstico para os homens aproximadamente 10 anos mais precoces. A variação da diferença de idade entre homens e mulheres em vários estudos depende de diferenças geográficas, climáticas e sócio-culturais. O CE labial é geralmente encontrado em pessoas de pele clara, porém algumas mulheres ou homens não leucodermas também apresentam CE labial com pouca alteração na incidência através dos anos (Neville et al., 2004).

Aproximadamente 30% dos CE bucais afetam o lábio e geralmente em localização paramediana (Bork et al., 1993; Saap et al., 1997). Surge no local onde o cigarro, o charuto ou cachimbo são colocados pelo paciente. Geralmente, se desenvolve no limite entre o vermelhão do lábio e a pele, com cerca de 90% dessas lesões ocorrendo no lábio inferior (Chen et al., 1992; Main; Pavone, 1994; Visscher et al., 1998). O crescimento do CE no lábio inferior é mais lento que no lábio superior (Regezi; Sciubba, 2000).

O CE de vermelhão se apresenta como uma lesão ulcerada ou não, endurecida, com necrose central, de crescimento lento, que geralmente ao ser diagnosticado clinicamente apresenta diâmetro menor que um centímetro. Pode ainda se apresentar como placas elevadas, firmes, verrucosas, brancas ou avermelhadas (Bork et al., 1993; Bentley et al., 2003). Há uma sintomatologia dolorosa mínima na fase inicial de crescimento, ocasionando um atraso na procura de tratamento, no qual o diagnóstico se dá entre 12 e 16 meses (Neville et al., 2004).

2.3.3 Diagnóstico diferencial

O câncer de lábio é predominantemente CE. Carcinoma de células basais ocorre apenas ocasionalmente na pele da região de junção da pele/vermelhão de lábio e raramente no vermelhão. Além disso, o carcinoma de células basais parece ser mais comum no lábio superior que no lábio inferior (Main; Pavone, 1994).

A leucoplasia pode ser confundida com CE quando a lesão se apresenta como uma placa verrucosa com aumento da espessura da mucosa (Bentley et al., 2003). Ainda, temos o ceratoacantoma que apresenta semelhança clínica e histopatológica com o CE bem diferenciado (6 meses a 1 ano), apesar do ceratoacantoma ter um crescimento mais rápido que o CE e regredir

espontaneamente (6 semanas a 2 meses) (Neville et al., 1998; Welbourne, 2003).

Massas exofíticas no lábio inferior podem também representar neoplasias de glândulas salivares, particularmente carcinoma mucoepidermóide. Condições inflamatórias como um granuloma piogênico e um granuloma eosinofílico traumático podem parecer com CE de lábio. Raramente, uma massa denominada tumor de células de Merkel pode surgir da pele do lábio inferior. Este tumor surge de células neuroendócrinas localizadas no epitélio da pele e ocorre em pacientes com mais de 60 anos (Welbourne, 2003).

2.3.4 Características histopatológicas

O CE é caracterizado por ilhas e cordões de células epiteliais malignas, que mostram diferenciação em direção a uma morfologia escamosa e invadem os tecidos adjacentes (Neville et al., 1998). A diferenciação escamosa, frequentemente é vista com formação de pérolas córneas, e crescimento invasivo. A invasão é caracterizada pela ruptura da membrana basal em direção aos tecidos subjacentes com infiltrado inflamatório. Invasão perineural, de vasos sanguíneos e linfáticos são sinais de malignidade. Esta neoplasia é graduada em bem, moderada e pobremente diferenciada. O CE bem diferenciado lembra o epitélio escamoso normal. O moderadamente diferenciado contém pleomorfismo nuclear, atividade mitótica

anormal e menor queratinização. E o pobremente diferenciado apresenta células imaturas, com numerosas mitoses típicas e atípicas e muito pouca queratinização.

Os lábios são tecidos ricamente vascularizados e geralmente o CE tem uma localização superficial com invasão moderada para dentro do músculo subjacente (Hjortdal; Berner, 1995).

2.3.5 Tratamento e Prognóstico

As biópsias incisionais com finalidade de diagnóstico e especialmente, as realizadas através do método de *punch* apresentam o risco de inoculação de células neoplásicas para dentro de tecidos subjacentes com disseminação para dentro dos vasos sanguíneos e linfáticos (Hjortdal; Berner, 1995).

A maioria dos casos de CE é tratada por excisão cirúrgica (Neville et al., 1998), mas radioterapia ou quimioterapia podem ser utilizadas em combinação com cirurgia, dependendo da localização, tamanho do tumor e presença de metástase (Ibsen; Phelan, 1996; Neville et al., 1998; Laskaris, 2004). Ao realizar a vermelhectomia a margem de segurança não deve ser inferior a 1 cm (Blomgren et al., 1988), porém Hjortdal e Berner (1995) estudando 30 casos de CE de lábio, verificaram que uma margem de segurança de apenas 3 a 4 mm não mostrou sinais de recorrência. Para um

tratamento mais seguro e efetivo pode ainda se realizar uma avaliação microscópica das margens da lesão no trans-cirúrgico pela técnica de congelação (Gooris et al., 2003).

O comportamento biológico do CE labial não segue o mesmo padrão descrito para pele e câncer intra-oral. O CE labial apresenta uma pior progressão da doença comparada ao CE de pele. Um CE labial originário de uma QA provavelmente apresenta um melhor prognóstico, similarmente ao que ocorre nos casos de pele (Abreu et al., 2006). Estes investigadores acharam em seus resultados menor ocorrência de metástase em CE apresentando QA adjacente (10,5%) do que CE sem QA adjacente (50%). Ainda afirmaram que a recorrência estaria mais relacionada ao insucesso do tratamento do que necessariamente da presença da QA concomitantemente.

No lábio superior 25% das lesões recorrem e a taxa de sobrevida de cinco anos é de 58%. No lábio inferior o prognóstico é melhor, apenas 8% recorrem e há 95 a 100% de taxa de sobrevivência em cinco anos (Eisen; Lynch, 1998; Neville et al., 1998). Fernández-Ángel et al. (2003) encontraram CE em 35,71% na comissura, 2,2% no terço médio e 5,63% paramediana à esquerda, sendo que as lesões localizadas em comissura apresentaram metástase em linfonodos e pior prognóstico comparado às outras localizações em lábio inferior.

O prognóstico ainda depende do tamanho da lesão durante o diagnóstico e do padrão histológico (Laskaris, 2004). Os carcinomas de lábio bem diferenciados causam metástase em 6% dos casos e os indiferenciados em 52% dos casos (Reichart; Philipsen, 2000). A metástase para os linfonodos geralmente acometem os

linfonodos submentonianos e submandibulares, sendo mais provável em lesões grandes e pouco diferenciadas (Regezi; Sciubba, 2000). Para Robinson (1989) o CE de lábio sofre metástase em aproximadamente 11% dos casos, enquanto na pele esse índice é bem menor (1%).

A preservação engloba o exame na região oral e de cabeça e pescoço de 4 em 4 meses por 2 anos e após esse período de 6 em 6 meses (Welbourne, 2003).

2.4 Família HER

2.4.1 Receptores e ligantes da família HER

Proteínas HER pertencem à subclasse I da superfamília dos receptores tirosina quinase. Este sistema receptor consiste de 4 membros: HER-1, também conhecido como receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), HER-2, HER-3 e HER-4 (Olayioye et al., 2000). Apresentam também outras denominações na literatura (Quadro 1).

Esses receptores são expressos em tecidos de origem epitelial, mesenquimal e neural com papel no desenvolvimento, proliferação e diferenciação (Olayioye et al., 2000).

Todos os membros dessa família apresentam em comum um domínio extracelular, uma região transmembrana e um domínio citoplasmático (Olayioye et al., 2000) (Figura 1).

A localização dos membros da família HER é relatada na literatura estar situada mais comumente na membrana (Xia et al., 1999; Ibrahim et al., 1999; Bei et al., 2001; Mrhalova et al., 2003; Ekberg et al., 2005) e citoplasma (Xia et al., 1999; Ibrahim et al., 1999; Bei et al., 2001; Ekberg et al., 2005). A localização nuclear também vem sendo descrita (Lin et al., 2001; Grivas et al., 2007; Frogne et al., 2009; Li et al., 2009), porém com função e mecanismo de translocação ainda não totalmente determinados.

ESTRUTURA

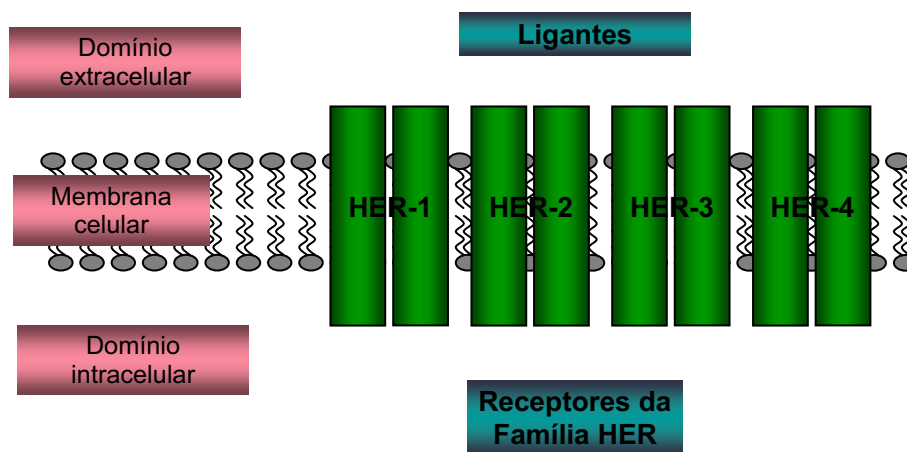


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura dos receptores da família HER: domínio extracelular, região transmembrana e domínio intracelular

O HER-1 é uma proteína com peso molecular de 170 quilodáltons (kDa), sendo expressa em baixos níveis na superfície da maioria das células adultas normais, com exceção das células hematopoiéticas (O-charoenrat et al., 2002).

O HER-2 apresenta peso molecular de 185 kDa (Soto-Cruz et al., 2008), atribuído ao gene localizado no cromossomo 17q (Yeon; Pegram, 2005). Essa proteína possui uma particularidade em relação aos outros receptores da família HER, sua íntima disposição e interação entre os seus domínios (L1 e L2). Essa característica incapacita a ligação entre o ligante e o receptor (Citri et al., 2003; Garrett et al., 2003) e explica a razão de ser o parceiro preferido na heterodimerização com os outros receptores da família HER (Citri et al., 2003). Outra possibilidade para explicar a falha da formação de homodímeros pelo HER-2 é a repulsão eletroestática (Garrett et al., 2003).

O HER-3 é uma glicoproteína transmembrana com 180 kDa, codificada por um gene localizado no cromossomo 12q13 (Grivas et al., 2007). A mais alta proporção de sequência de identidade com o HER-3 está localizada nos domínios catalíticos do HER-1 (60%), HER-2 (62%) e HER-4 (63%) (Prigent; Gullick, 1994). A proteína HER-3 é diferente da proteína HER-1 e HER-2, porque não tem uma atividade tirosina quinase intrínseca, mas pode ser transfosforilizada por HER-1 e HER-2 (Rogers et al., 2005).

Por último, HER-4, quarto membro da família HER, apresenta peso molecular 180 kDa. Seu domínio citoplasmático é

altamente homólogo (80%) ao HER-1 e ao HER-2 (Culouscou et al., 1993; Prigent; Gullick, 1994).

Os receptores são ativados por vários ligantes específicos. Os ligantes apresentam estrutura similar ao fator de crescimento epidermal (EGF), ou seja, 45-55 aminoácidos e incluindo 6 resíduos de cisteína que formam 3 voltas (Casalini et al., 2004). São divididos em 3 grupos. O primeiro grupo inclui EGF, anfiregulina (AR) e fator de crescimento de transformação alfa (TGF- α), que se liga ao HER-1; o segundo grupo corresponde a betacelulina (BTC), heparina (HB) e epiregulina (EPR), que apresenta dupla afinidade com HER-1 e HER-4; o terceiro grupo, neuregulina (NRG). A NRG-1 e NRG-2 se ligam ao HER-3 e HER-4 e a NRG-3 e NRG-4 se ligam somente ao HER-4 (Quadro 1). Até o momento nenhum ligante foi reconhecido para o HER-2 (Holbro et al., 2003), porém a proteína HER-2 pode ser ativada quando sofre heterodimerização. Por exemplo, a neuregulina se liga aos receptores HER-3 e HER-4 que leva a transfosforilação do HER-2 (Esteva et al., 2001).

Em carcinomas humanos, a co-expressão não é limitada somente aos receptores, podendo ocorrer também com ligantes. Tanto células neoplásicas quanto células do estroma ao redor são consideradas fontes de ligantes da família HER (Normanno et al., 2006).

Quadro 1 - Especificidade da ligação de ligantes para receptores da família HER

LIGANTES	RECEPTORES			
	HER-1	HER-2	HER-3	HER-4
	ErbB-1	ErbB-2	ErbB-3	ErbB-4
	EGFR	Neu		
EGF	+			
AR	+			
TGF-α	+			
BTC	+			+
HB	+			+
EPR	+			+
NRG1			+	+
NRG2			+	+
NRG3				+
NRG4				+

(+): positivo

2.4.2 Vias de sinalização da família HER

O tipo e duração das vias de sinalização da família HER dependem de diversos fatores como disponibilidade do ligante (Rogers et al., 2005), tipo de ligante (Normanno et al., 2006), abundância dos receptores (El Sheikh et al., 2004; Rogers et al., 2005), presença de receptores ativos (Rogers et al., 2005), composição do complexo receptor e determinantes estruturais específicos dos receptores (Normanno et al., 2006). Por exemplo, os ligantes da família HER ativam não só receptores homodímeros como também heterodímeros, expandindo o potencial de sinalização através da amplificação e diversificação da sinalização. O sinal oriundo da

heterodimerização não se resume somente a somatória dos efeitos dos parceiros individualmente, mas sim as propriedades únicas adquiridas através do processo de heterodimerização (Olayioye et al., 2000). A internalização prejudicada do HER-2 é outro fator que leva a sinalização prolongada de complexos receptores que contêm este receptor, onde dímeros contendo HER-3 e HER-4 podem ativar diretamente o fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Normanno et al., 2006).

As vias de transdução de sinal ocorrem quando os receptores da família HER se ligam aos ligantes, formando homo ou heterodímeros, e conseqüentemente levando a fosforilação de resíduos de tirosina específicos. Estes resíduos servem como locais de ligação para proteínas (Olayioye et al., 2000; Normanno et al., 2006). Ocorre recrutamento de proteínas como Shc, Grb7, Grb2, Crk, Nck, PLC- β , quinases intracelulares como Src e PI3K, proteínas tirosinas fosfatases como SHP1 e SHP2 e Cbl E3 ubiquitina ligase que desencadeiam as vias de sinalização intracelular. Todos os ligantes e receptores da família HER desencadeiam a via ras/raf/MEK/MAP quinase (MAPK) pelas proteínas adaptadoras Grb2 ou Shc. A ativação do PI3K acontece por recrutamento do p85 para os receptores ativados. Por último, os receptores da família HER ativam vários fatores de transcrição como c-fos, c-Jun, c-myc, STATs, fator nuclear Kappa B (NF-kB) e membros da família E-26 (Ets) (revisado por Normanno et al., 2006) (Figura 2). Cada receptor da família HER possui um padrão diferente de locais de autofosforilação C-terminal,

ocorrendo uma grande sobreposição de vias de sinalização ativadas pelos 4 receptores (Olayioye et al., 2000).

Dentre os 4 receptores da família HER, o HER-3 é o maior ativador do PI3K devido a vários sítios de ligação localizados no seu domínio C-terminal e um no seu domínio quinase (Prigent; Gullick, 1994).

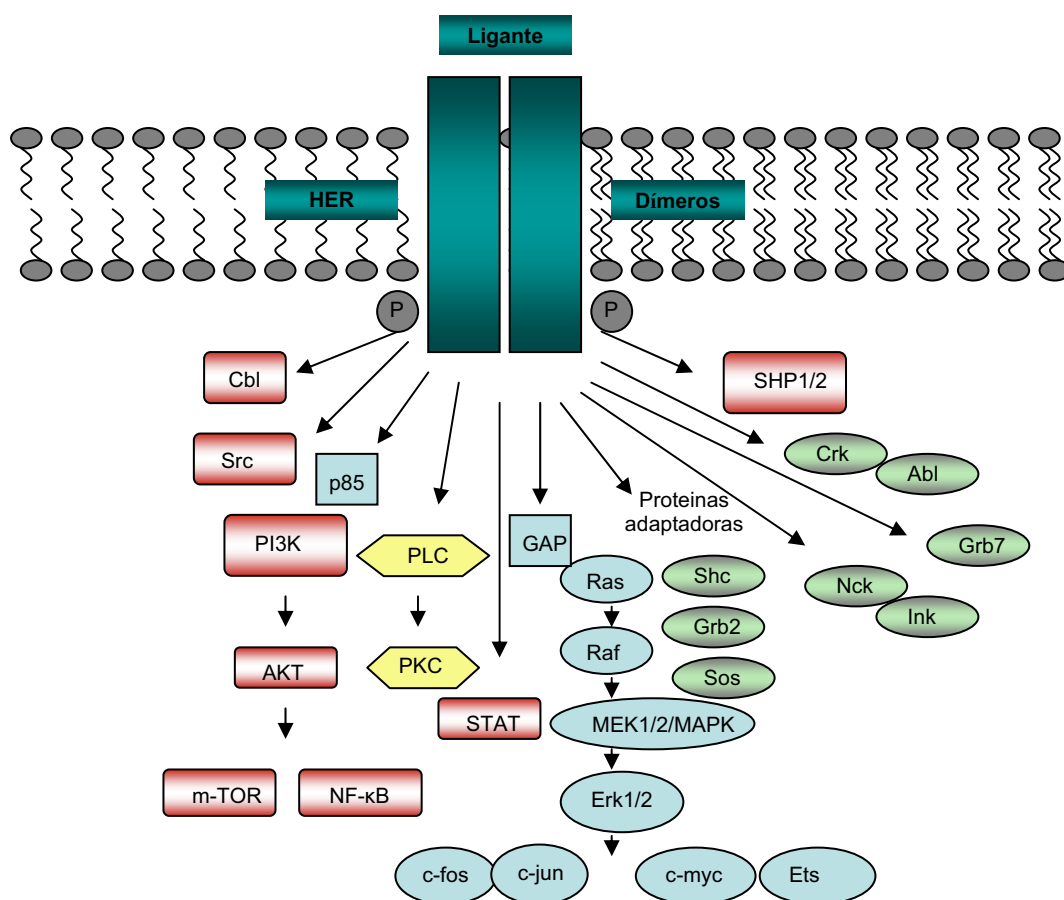


Figura 2 - Cascata de sinalização da família HER

Outro mecanismo que induz a fosforilação de receptores da família HER e subsequente sinalização intracelular é conhecido como transativação (Normanno et al., 2006). Por exemplo,

agonistas do receptor acoplado a proteína G (GPCR) podem transativar o HER-1 através de um não receptor tirosina quinase chamado c-Src. Sendo que são citados duas possíveis vias: agonista→ GPCR→ proteína G heterotrimérica→ PLC→ IP₃→ Ca²⁺→ Pyk2→ Src→ HER-1 ou agonista→ GPCR→ proteína G heterotrimérica→ βark→ arrestina:complexo GPCR→ complexo GPCR-arrestin-Src→ HER-1 (Carpenter, 1999). A transativação também ocorre com outras classes de receptores como os receptores de citocinas (Carpenter, 1999; Olayioye et al., 2000), receptores da integrina e de adesão celular como também com agentes de despolarização da membrana, agentes químicos e físicos estressores exógenos (Carpenter, 1999). Logo, os receptores da família HER possuem também a função de integrar as sinalizações pela interação com as mais variadas proteínas sinalizadoras e receptores de membrana (Normanno et al., 2006).

Tanto por via de transdução ou de transativação é muito mais importante biologicamente o número de receptores na forma ativa do que o número total de receptores presentes, já que a fosforilação do receptor é indicativo de atividade da sinalização (Thor et al., 2000).

2.4.3 Interação entre as vias de sinalização induzidas pela radiação UV e a família HER

Estímulos externos, entre eles a radiação UV iniciam vias de transdução de sinais em resposta ao estresse gerado. Certamente, outros receptores tirosinas quinases são também afetados. O uso de inibidores de HER-1 e/ou por expressão de HER-1 dominantes negativos bloquearam a capacidade dos estressores em ativar a MAPK e a expressão de alguns genes. O HER-1 foi interpretado como uma peça importante para o início da sinalização frente a tal estímulo (Carpenter, 1999).

Mecanismos sugeridos para a ativação do HER-1 pela UV seriam aumento da secreção de ligantes similares ao EGF/outros fatores ativadores ou a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) que também desencadeiam a cascata de sinalização da radiação UV. Comprovação da dependência de ROI na ativação do HER-1 pela UV foi constatada. ROI participa assim de uma das principais vias na indução do gene fator de resposta de crescimento precoce (Egr-1) (Huang et al., 1996), um fator de transcrição com papel de proteção frente à UV (Huang; Adamson, 1995). Além desses mecanismos citados acima, há outra possibilidade para que a radiação UV ative o HER-1 de forma indireta pela inativação da fosfatase fosfotirosina (Carpenter, 1999).

A ativação do HER-2 também pode ser considerada em resposta a radiação e ainda, devido à heterodimerização do HER-2

com seus parceiros: HER-1 (Carpenter, 1999), HER-3 e HER-4, estes também podem ser ativados pela radiação UV e outros agentes adversos (Knebel et al., 1996).

2.4.4 Papel da família HER no câncer

Os receptores da família HER têm um papel importante na transformação e progressão da neoplasia maligna (Shankaran et al., 2006). Além da atividade reguladora do crescimento podem alterar estados de diferenciação, metabolismo, organização citoesquelética e outras funções biológicas não necessariamente ligadas ao sinal mitogênico (O-charoenrat et al., 2002b).

O efeito dos ligantes da família HER na proliferação das células do CE de cabeça e pescoço é complexo e dependem de vários fatores, entre eles, o número e tipo de receptores de superfície celular, afinidade de receptores pelos ligantes e a produção autócrina dos diferentes ligantes. Em doses baixas, o EGF estimulou o crescimento e propiciou uma ativação moderada e prolongada da MAPK, e em altas doses induziu uma ativação precoce e transiente da MAPK e inibiu o crescimento. Simultaneamente, as fosfatases que inativam a MAPK foram ativadas pelo EGF em altas doses, mas não em baixas doses (O-charoenrat et al., 2002b). O efeito proliferativo também envolve o HER-2. A interferência na sinalização do HER-2 em células neoplásicas que superexpressavam esse receptor tiveram

efeitos antiproliferativos intensos, atingindo reguladores da fase G1 como myc, ciclinas do tipo D, complexos da ciclina E/cdk2 e inibidor da quinase dependente de ciclina p27Kip1 (Holbro et al., 2003).

As células neoplásicas também evitam a apoptose pela via de sinalização da família HER. Uma das vias ativadas pela família HER é a PI3K/PKB, importante em mediar à sobrevivência da célula já que os substratos PKB regulam vários processos apoptóticos (Holbro et al., 2003).

Os receptores da família HER podem controlar muitos processos importantes da angiogênese e invasão do CE. Ligantes do HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4 afetam a adesão celular via regulação da E-caderina e proteínas desmossomais. Também altera a relação celular-tumoral com a matriz extracelular via alterações na expressão de integrinas. A mobilidade celular é aumentada, e a regulação aumentada de metaloproteases (MMPs) por sinalizadores HER podem liberar células tumorais e fatores de crescimento celular endotelial/fatores quimiotáticos. Isso potencializa a invasão da matriz extracelular e da membrana basal por proteólise. A ativação de HER também regula a expressão do fator de crescimento endotelial vascular-A e C (VEGF-A e o VEGF-C). Além disso, estimula a proliferação de células endoteliais sanguíneas e linfáticas, e aumenta a permeabilidade vascular. A atividade angiogênica aumentada sustenta o crescimento do tumor primário, potencializa a disseminação e o estabelecimento de micrometástases. Embora a maioria dessas ocorrências sejam *in vitro* e em modelos pré-clínicos, observações correlatas em material clínico sugerem que os receptores

da família HER podem também estar relacionados ao CE de cabeça e pescoço (Rogers et al., 2005). O-charoenrat et al. (2002a) estudaram o perfil dos 4 receptores da família HER em CE de cabeça e pescoço e suas correlações clínicas com MMPs e VEGF. Verificaram que a expressão aumentada de HER-1, HER-2 e HER-3 estavam relacionadas com invasão, metástase em linfonodos e estágio patológico avançado, o que não ocorreu com HER-4. HER-1 e HER-2 foram correlacionados mais intensamente com a expressão de algumas MMPs e VEGF do que HER-3 e HER-4.

2.4.5 Expressão da família HER em cânceres humanos /Prognóstico

Expressão desregulada tanto de receptores quanto dos ligantes da família HER tem sido relacionada ao desenvolvimento e a malignidade de inúmeros tipos de cânceres humanos (Olayioye et al., 2000), dentre eles carcinoma de mama (Stern, 2003; Wiseman et al., 2005), ovário (Slamon et al., 1989) e gástrico (Lemoine et al., 1991).

No carcinoma humano ocorrem alterações genéticas do HER-1 e HER-2, por mutação ou por amplificação gênica (Normanno et al., 2006). Superexpressão é geralmente decorrente de uma amplificação do gene (Lemoine et al., 1991).

A expressão do HER-1 representa um fator prognóstico negativo para pacientes com carcinoma de mama (Sainsbury et al., 1987; Lewis et al., 1990). E a expressão de HER-1 / pHER-1 têm

demonstrado ser mais representativo em prever o carcinoma de mama invasivo do que a expressão isolada de HER-1 e pHER-1 (Magkou et al., 2008).

HER-2 também está associado a muitos adenocarcinomas. Nos casos de expressão aumentada de HER-2 em câncer de mama, 96,5% são devidos à amplificação do gene (Pauletti et al., 1996). Taniyama et al. (2008) compararam a relação entre a expressão de HER-2 e pHER-2 (Tyr1248) e amplificação do HER-2 em carcinoma de mama. Os resultados indicaram que a expressão da forma ativa foi altamente específica para a amplificação do gene.

Em casos de adenocarcinoma pancreático descritos por Safran et al. (2001), não houve concordância entre a superexpressão e amplificação. Apesar do HER-2 estar superexpresso em uma parcela significativa de adenocarcinomas pancreáticos, a amplificação do gene foi responsável por parte da patobiologia de alguns destes, podendo não ser a causa da superexpressão de todas elas. Em relação ao prognóstico, somente 21% dos casos com expressão aumentada de HER-2 tiveram uma tendência a pior sobrevida.

Lemoine et al. (1991) concluíram que a expressão desregulada do HER-1 e HER-2 ocorre frequentemente no câncer do estômago. Isso na presença ou ausência da amplificação do gene, porque foi encontrado mais casos de superexpressão do que amplificação do gene. Não houve associação com estágio do tumor, envolvimento de linfonodos, nem com infiltração neoplásica.

O HER-2 foi expresso em linhagens de células de câncer coloretal e em adenocarcinoma coloretal humano, porém

apenas a localização na membrana do câncer colorretal primário e não no citoplasma foi associado à amplificação do gene. A expressão do HER-2 no citoplasma foi correlacionada positivamente com neoplasia bem ou moderadamente diferenciada, mas não com outras variáveis clinicopatológicas como estágio da neoplasia e dos linfonodos (Half et al., 2004).

O significado clínico da co-expressão da família HER foi analisado em diferentes cânceres humanos. Segundo Normanno et al., 2006 a co-expressão dos receptores da família HER se faz necessária para induzir transformação total tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Isso porque neoplasias com co-expressão são frequentemente associados a um fenótipo mais agressivo, e consequentemente pior prognóstico.

Wiseman et al. (2005) encontraram um efeito negativo sinérgico nos resultados dos pacientes com carcinoma de mama que expressavam HER-1, HER-2 e HER-3.

Segundo te Velde et al. (2009), HER-1 e HER-2 não foram superexpressos nos adenocarcinomas pancreáticos, enquanto o HER-3 e HER-4 demonstraram perda de suas expressões comparada ao pâncreas normal (28% e 79%, respectivamente).

Lee et al. (2005) avaliaram a expressão de HER-1, HER-2 e HER-3 e amplificação do HER-2 em carcinoma de ovário em estágio avançado. O HER-1 foi expresso em 9,1%, HER-2 em 4,9% e HER-3 em 3%. Houve 11% de co-expressão de HER-1 e HER-2 em carcinoma ovariano em estágio precoce. Em nenhum dos casos em estágio avançado houve superexpressão de HER-1 e HER-2.

Por fim, não ocorreu também correlação significativa entre superexpressão e amplificação do HER-2 em carcinoma de ovário.

2.4.6 Expressão da família HER em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço / Prognóstico

Segundo a literatura, a expressão da família HER em CE de cabeça e pescoço apresenta variações. Mariezkurrena et al (2005) encontraram HER-1 expresso em 41% de todos os casos de CE de cabeça e pescoço. Grandis e Tweardy (1993) observaram em sua amostra que HER-1 e seu ligante TGF- α , foram expressos em torno de 80 a 90% dos casos. Consideraram que a expressão aumentada do HER-1 seria um evento inicial na carcinogênese do CE de cabeça e pescoço, que está presente na mucosa normal de pacientes com câncer quando comparada à mucosa de pacientes sem câncer (controle).

Shin et al. (1994) analisaram 36 casos de CE de cabeça e pescoço, tecido normal e lesões potencialmente malignas adjacentes a neoplasia, e 4 casos controle de epitélio oral normal. Na mucosa normal do grupo controle detectou-se baixa expressão de HER-1 e no epitélio normal adjacente ao CE a expressão de HER-1 foi duas vezes maior quando comparada à mucosa normal. A expressão de HER-1 manteve-se elevada na hiperplasia e displasia, aumentando consideravelmente no CE.

Há poucos estudos da amplificação do gene e expressão em CE de cabeça e pescoço. Os resultados de Ishitoya et al. (1989) demonstraram que havia uma correlação entre amplificação do gene e expressão do receptor, mas em algumas amostras de CE haviam superexpressão sem a ocorrência de amplificação. Indicação de que a amplificação não é o único mecanismo no qual o nível de HER-1 pode ser aumentado.

Hiraishi et al. (2006) encontraram 93% de casos de CE da região oral e maxilofacial com expressão de HER-1 e 98% com expressão de pHER-1(Tyr 1173). Houve apenas correlação entre expressão elevada de HER-1 e invasão neoplásica.

A expressão aumentada de HER-1 no CE de cabeça e pescoço foi correlacionada com tamanho e estágio do tumor (Santini et al., 1991). Pode ainda estar associada de uma forma generalizada a um prognóstico pobre (Rogers et al., 2005).

O HER-2 tem sido detectado em torno de 40% a 60% dos carcinomas de cabeça e pescoço (Parise Jr et al., 2004).

Os achados imunoistoquímicos da expressão de HER-2 em lesões benignas e malignas sugeriram que essa proteína tem sua expressão aumentada no CE (2,7) e expressão menos intensa nas displasias (1,5), hiperplasias (1,3) e na mucosa normal (1,0). A expressão fraca e eventual de HER-2 na mucosa normal é explicada pelo baixo *turn over*. Nos casos de displasia e hiperplasia houve imunomarcagem com expressão mais forte devido ao alto *turn over* celular e proliferação rápida pelo HER-2. No CE a expressão mais forte foi correlacionada com a diferenciação celular baixa. Esses

achados levaram os autores a concluir que quanto mais baixo o grau de diferenciação celular mais alta a expressão de HER-2 (Wilkman et al., 1998).

Xia et al. (1997) detectaram expressão de HER-2 em linhagem de células orais, porém não em células de cabeça e pescoço. Além disso, encontraram 86% dos casos de CE orais primários com imunoreatividade a HER-2 e uma forte correlação entre expressão de HER-2 e tempo de sobrevida curta em pacientes com CE.

Albuquerque Jr. et al. (2003) ao correlacionar a expressão de HER-2 e proteína S-100 com grau de malignidade e local anatômico em CE oral, não observaram correlação entre HER-2 e grau de malignidade. Porém, foi verificado que HER-2 estava positivo na maioria dos casos localizados na língua, levando a sugerir que a carcinogênese na língua poderia apresentar relação entre anormalidades funcionais e a expressão do oncogene HER-2. Quanto à marcação com S-100, não houve correlação com a localização anatômica e foi inversamente proporcional ao grau de malignidade. Um dado importante a ser salientado é que todos os casos considerados de baixo grau exibiram positividade fraca para S-100 e estavam localizados no lábio inferior.

Xia et al. (1999) realizaram uma comparação isolada e combinada da expressão da família HER no CE oral. Foi verificado que quando os 4 receptores estavam presentes, havia associação com curta sobrevivência e metástase à distância, e que o HER-2 foi o mais significativo em predizer o CE. A expressão combinada de HER-1,

HER-2 e HER-3 seriam melhores em prever a evolução do CE do que a expressão isolada das proteínas.

2.4.7 Fármacos

O melhor entendimento das alterações moleculares e a identificação de oncogenes potenciais no câncer bucal oferecem novas formas de terapia (Rogers et al., 2005). Tratamento com anticorpos terapêuticos que se ligam ao receptor HER inibindo sua ativação ou pequenas moléculas que inibam a função do receptor e bloqueiam o trifosfato de adenosina (ATP), sítio de ligação da kinase, já fazem parte de procedimentos terapêuticos na atualidade (Rabindran, 2005). A inibição também pode ser através de inibidores da tirosina quinase (Li et al., 2009). A co-expressão tanto de diferentes receptores da família HER quanto dos seus ligantes na maioria dos carcinomas humanos nos faz pensar também na combinação de moléculas atingindo diferentes alvos para bloquear o crescimento da neoplasia (Normanno et al., 2006).

As alterações genéticas tais como amplificação de gene e mutações são encontradas nos cânceres humanos. No caso do HER-1, a amplificação ou alta polissemia pode estar associada com resposta aumentada a agentes anti-HER-1 em diferentes tipos de carcinoma em comparação com os casos com mutação (Normanno et al., 2006). Em câncer de cabeça e pescoço, mutação do gene HER-1

foi encontrada em aproximadamente 7% dos casos (Lee et al., 2005). Em contrapartida, o gene HER-2 não sofre mutação frequente em carcinomas (Normanno et al., 2006).

O HER-2 pode contribuir para a malignização com outros receptores da família HER no desenvolvimento neoplásico, sendo o parceiro preferido e envolvido em várias neoplasias humanas (Olayioye et al., 2000), portanto alvo preferido para fármacos inibidores. O Trastuzumab® (Herceptin) tem sido utilizado em estudos em humanos como uma alternativa de tratamento, por exemplo, em câncer de mama metastático onde há superexpressão de HER-2. Quando utilizado isoladamente, produziu resposta duradoura, sendo bem tolerável e com poucos efeitos colaterais (Cobleigh et al., 1999). A sua indicação deve ser criteriosa e seletiva já que alguns tipos de cânceres humanos como o adenocarcinoma pancreático apresenta rara amplificação do gene verdadeira, sendo assim incerta a efetividade do Trastuzumab® neste tipo de carcinoma (Saxby et al., 2005). Há a necessidade da identificação de quais neoplasias são realmente sensíveis e quais apresentam resistência a novas terapias (El Sheikh et al., 2004).

Nem todos os casos que superexpressam a proteína HER-2 respondem aos anticorpos HER-2 e devido à interação com os outros receptores da família HER, inibidores de tirosina quinase também podem ser utilizados na abordagem do tratamento do câncer (Olayioye et al., 2000). O Lapatinib® é um tipo de inibidor de tirosina quinase que atua na atividade de HER-1 e HER-2 (Spector et

al., 2005). O CI-1033 tem como alvo os 4 membros da família HER logo, sendo um inibidor pan HER (Zimmermann et al., 2006).

As estratégias de inibição através de anticorpos monoclonais e inibidores da tirosina quinase são promissoras no tratamento antitumoral de câncer colorretal metastático, câncer pulmonar não de células pequenas, câncer de mama e CE de cabeça e pescoço. Porém, somente 10 a 20% dos pacientes respondem clinicamente. Uma das possíveis razões para que se ocorra à resistência adquirida das células ao cetuximab®, erlotinib®, gefitinib® (inibidores de HER-1) seria o aumento da atividade aumentada da família Src quinase (SFK), o qual está ligado a translocação do HER-1 para o núcleo. O HER-1 expresso no núcleo pode ser crítico na resistência ao cetuximab® e nestes casos deve ser utilizado concomitantemente com o Dasatinib® (inibidor SFK) (Li et al., 2009).

Apesar de poucos estudos já se podem encontrar alguns recentes envolvendo a forma ativa dos receptores e avaliando as respostas ao trastuzumab®, doxorubicin® ou tamoxifen® (Thor et al., 2000).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi verificar a expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados e possíveis correlações das expressões destas proteínas com lesões de QA e CE de lábio inferior.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra

Foram estudados 50 casos de QA em lábio inferior e 50 de CE primário em lábio inferior com diagnóstico clínico e histopatológico, atendidos no Ambulatório da Disciplina de Propedêutica Estomatológica, da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. O grupo controle correspondeu a 14 espécimes de lesões benignas localizados em lábio inferior.

Os blocos de parafina utilizados neste estudo foram selecionados no arquivo do Laboratório da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

4.2 Procedimento ambulatorial

A QA é uma lesão multifocal (Figura 3a), a semimucosa labial pode ter áreas atróficas e/ou eritematosos, áreas com manchas ou placas brancas, palidez, ressecamento (com aspecto

sulcado e/ou descamação), aumento volumétrico (infiltração) e úlcera. A biópsia é sempre incisional e na área de maior expressividade clínica da lesão considerando a seguinte prioridade:

- Úlcera e/ou mancha ou placa branca e/ou eritemato-atrófica;
- Mancha e/ou placa branca com área atrófica e/ou eritemato-atrófica.

Pelo aspecto clínico multifocal da QA, quando há úlcera com mais de 15 dias de evolução e sem relato de cicatrização o CE deve ser considerado no diagnóstico diferencial (Figura 3b).

Os pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de QA foram orientados a usar FPS labial e a fazer retorno periódico, enquanto os pacientes com diagnóstico histopatológico de CE em lábio com ou sem QA concomitante foram encaminhados para tratamento com médico cirurgião de cabeça e pescoço. Cabe esclarecer que muitos pacientes não retornam para a preservação periódica do caso.

Na sessão para a realização da biópsia os pacientes preencheram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). O Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade aprovou a realização desta pesquisa: 06/2007-PH/CEP (Anexo A e B).



Figura 3 - A) Aspecto multifocal da QA em lábio inferior; B) Vermelhão do lábio comprometido por lesões de QA e CE

4.3 Procedimento laboratorial

Os espécimes de novas biópsias foram fixados em formol a 10% e enviados para o Laboratório da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP para serem incluídas em blocos de parafina para posterior procedimento histotécnico. Os cortes de 5 μ m foram analisados histomorfologicamente para diagnóstico final de QA e CE através de coloração de hematoxilina e eosina (HE) (Figura 4a, Figura 4b), enquanto cortes semi-seriados de 3 μ m foram realizados para a análise imunoistoquímica.

As classificações quanto ao grau de atipia da QA foram as adotadas nos laudos anátomo-patológicos baseadas em padrões histológicos (Banóczy; Csiba, 1976; van der Waal et al., 1986) como a presença ou não de:

- Prolongamento epitelial em forma de gota;
- Perda da polaridade das células basais;

- Hiperplasia da camada basal;
- Estratificação epitelial irregular;
- Pleomorfismo celular e nuclear;
- Anisocitose;
- Hiperchromatismo celular;
- Aumento da proporção núcleo-citoplasma;
- Proliferação celular;
- Aumento de mitoses, superficiais e anormais;
- Coesão celular reduzida;
- Queratinização abaixo da superfície epitelial.

Segundo Banoczy e Csiba (1976), a gradação da atipia epitelial depende da quantidade de alterações presentes:

- Sem atipia: menos de 2 alterações histopatológicas;
- Atipia leve: presença de 2 alterações histopatológicas;
- Atipia moderada: presença de 2 a 4 alterações histopatológicas;
- Atipia grave: presença de 5 ou mais alterações histopatológicas.

O sistema binário de gradação da atipia dividido em categorias (Kujan et al., 2006) foi realizado especificamente para esta pesquisa através da análise de todo o corte, em cada caso, por 2 observadores, sendo um patologista experiente e um aluno da Pós-graduação. A avaliação por escore baseou-se em critérios de arquitetura e citologia descritos na classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2005, sendo os critérios de arquitetura:

- Estratificação epitelial irregular;
- Perda da polaridade das células basais;
- Projeções epiteliais em forma de gota;

- Número aumentado de figuras mitóticas;
- Mitoses superficiais em localização anormal;
- Queratinização prematura de células isoladas;
- Pérolas córneas dentro das projeções epiteliais.

E os critérios citológicos:

- Variação anormal no tamanho nuclear;
- Variação anormal na forma nuclear;
- Variação anormal no tamanho celular;
- Variação anormal na forma celular;
- Aumento na proporção núcleo-citoplasma;
- Aumento no tamanho nuclear;
- Figuras mitóticas atípicas;
- Aumento do número e tamanho do nucléolo;
- Hiperchromatismo.

Quando observado no mínimo a presença de 4 alterações de arquitetura e 5 citológicas se considera uma lesão de alto risco, ou seja, com susceptibilidade potencial para transformação maligna. Ao contrário, das lesões de baixo risco sem essa susceptibilidade ao qual apresentam menos de 4 alterações de arquitetura e 5 citológicas.

A gradação histopatológica do CE utilizada neste estudo foi a mesma adotada nos laudos anátomo-patológicos. As lesões foram graduadas em uma escala que variava de I a III (Neville et al., 2004).

- Grau I, grau baixo ou bem diferenciado: Neoplasia madura que se assemelha ao tecido de origem com crescimento lento e metastizará provavelmente;
- Grau II, grau moderado: Neoplasia intermediária entre o grau I e III;
- Grau III, grau alto ou pobremente diferenciado: Neoplasia imatura com muito pleomorfismo celular e nuclear, pouca ou nenhuma produção de queratina.

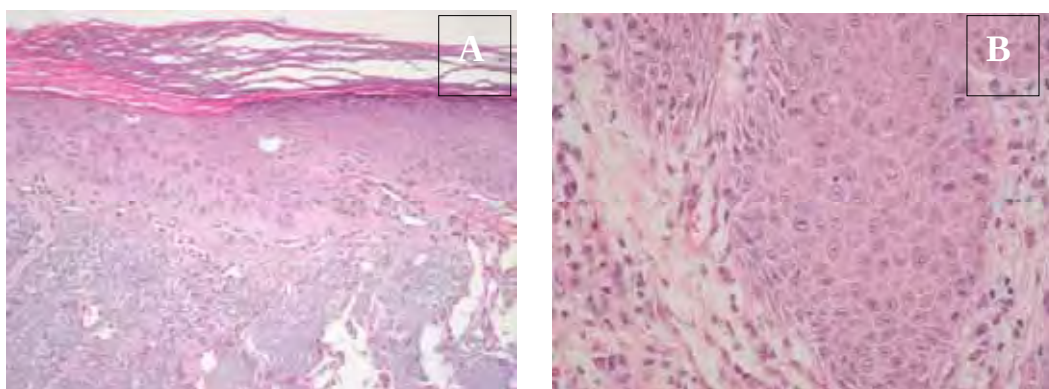


Figura 4 - A) Fotomicrografia de lesão de QA mostrando atipia epitelial com hiperortoqueratose e degeneração basofílica no tecido conjuntivo. (HE. Aumento original 200X); B) Fotomicrografia de CE mostrando hiper Cromatismo, pleomorfismo celular e nuclear no CE de lábio (HE. Aumento original 400X).

As técnicas de cultura celular e xenoenxertia foram realizadas para otimização da técnica imunoistoquímica e posterior utilização dos cortes como controles positivos.

4.3.1 Cultura de células

Foi realizado cultura de células a partir de linhagens celulares de carcinoma da região de cabeça e pescoço: HN4, CAL27 e 11A. As linhagens celulares descritas são oriundas da coleção do *Tumour and Biology and Metastasis Team*. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de oxigênio (Figura 5a). As células cresceram em frascos contendo meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FCS) (Figura 5b). As células ao atingirem a pré-confluência eram desprendidas dos frascos com Tryp-LE (Invitrogen, UK). Os tubos contendo as células em DMEN foram centrifugados no programa 4 (1500 rpm por um período de 3 min) formando um *pellet*. Em seqüência, as células foram ressuspensas em uma mistura de Matrigel (BD Biosciences, UK), um veículo que mimetiza a matriz extracelular e no meio balanceado de Hank, antes de ser injetado nos animais para estabelecer modelos de xenoenxertia.



Figura 5 - A) Incubadora a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de O₂; B) Frascos de plásticos contendo DMEM com 10% de FCS

4.3.2 Xenoenxertia

Aproximadamente 1×10^6 células foram injetadas em camundongos subcutaneamente na região do flanco. Quando a lesão neoplásica atingira aproximadamente 1 cm de diâmetro os animais eram sacrificados para remoção da neoplasia. A peça era fixada em formol a 10%, processada *overnight* no *Tissue Tek Processor* (GMI Inc.) no programa 1 e emblocada em parafina, sendo confeccionada lâminas com cortes de 3 μ m em espessura para posterior otimização da técnica imunoistoquímica.

4.3.3 Otimização da técnica imunoistoquímica

A otimização da técnica imunoistoquímica a ser empregada foi a partir do estudo de diferentes substâncias, tempos e métodos de recuperação antigênica, diluições dos anticorpos, como também tempo de incubação dos reagentes que melhor se adequasse a nossa amostra e a marcação pretendida. Os xenoenxertos correspondentes as linhagens de células que demonstravam moderada à alta expressão (CAL27 e HN4) e baixa ou negativa expressão da família HER (11A), previamente determinadas pela citometria de fluxo por FACScan® (Becton Dickinson), serviram como parâmetros para se determinar as diluições dos anticorpos a serem padronizados em nossa amostra. Consequentemente, os xenoenxertos com expressão conhecida das proteínas estudadas serviram como controles positivos.

4.3.4 Imunoistoquímica

Os cortes histológicos foram montados em lâminas de vidro tratadas previamente com organosilano, a fim de evitar o descolamento destes durante a imunocoloração. A desparafinização foi realizada em histo-clear II TM (National Diagnostics,

Leicestershire, UK) por 5 minutos e a reidratação em álcool etílico em concentrações decrescentes. Em seguida, foram lavadas em álcool a 95% e hidróxido de amônia a 10% por 5 min. A recuperação antigênica foi realizada com proteinase K (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) por 5 minutos para HER-1 e ácido cítrico a 1% para pHER-1 e pHER-2 em microondas por 15 minutos. O anticorpo HER-2 não necessitou de recuperação antigênica. Bloqueiou-se a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 1% (VWR International, Lutterworth, UK) em água deionizada por 20 min. Os cortes foram incubados com os anticorpos HER-1 31G7 (Zymed, Paisley, UK), HER-2 12 (ICR, Sutton, UK, pHER-1 (Tyr1173) e pHER-2 (Tyr 1221/1222) (Cell Signaling, Hitchin, UK) *overnight* em temperatura ambiente (Quadro 2). Incubação por 2 h com anticorpo secundário anti-rato, anti-camundongo e anti-coelho 1:500 (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) foi realizado para HER-2, HER-1, pHER-1 e pHER-2, respectivamente. Em seguida, foi utilizado o kit ABC Vectastain PK6101 (Vector, Peterborough, UK) por 2 h e o cromógeno diaminobenzidina (DAB) Impact TM (Vector, Peterborough, UK) por aproximadamente 10 min. Contra corou-se com Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK). Finalmente, desidratação em série de alcóois etílicos, passagem em xilol e montagem das lâminas com Vectamount H-5000 (Vector, Peterborough, UK).

Foram realizados os controles positivos e negativos (ausência do anticorpo primário) nas reações imunoistoquímicas (Figura 6).

Quadro 2 - Resumo dos anticorpos, métodos utilizados e controles positivos

Anticorpo	Clone	Recuperação antigênica	Diluição	Controle positivo	Fabricante
EGFR monoclonal	31G7	Proteinase K	1 100	CAL27 xenoenxerto	Zymed
pEGFR monoclonal (Tyr 1173)	53A5	Ácido cítrico	1 100	CAL27 xenoenxerto	Cell Signaling
HER-2 monoclonal		Sem recuperação	1 300	HN4 xenoenxerto	ICR
pHER-2 monoclonal (Tyr 1221/1222)	6B12	Ácido cítrico	1 100	HN4 xenoenxerto	Cell Signaling

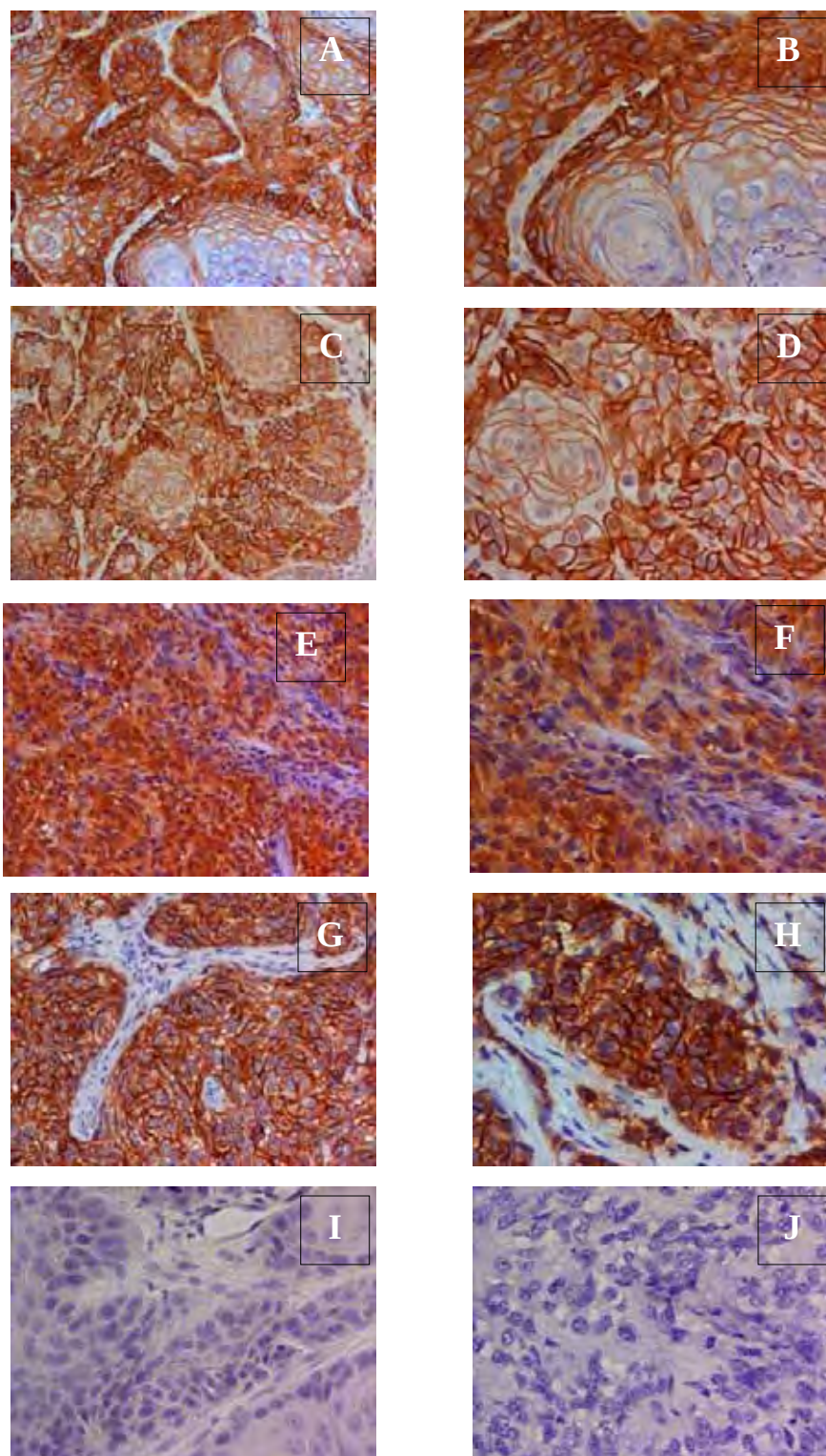


Figura 6 - Controles positivos: A) e B) HER-1 (CAL27); C) e D) pHER-1 (CAL27); E) e F) HER-2 (HN4); G) e H) pHER-2 (HN4). Controles negativos: I) CAL27; J) HN4. (A; C; E; G. Aumento original 200X). (B; D; F; H; I; J. Aumento original 400X).

4.4 Interpretação da marcação imunoistoquímica

A análise da expressão das proteínas marcando a membrana, citoplasma e núcleo basearam-se num escore do Herceptest (DAKO) e de marcação global adaptado (Frogne et al., 2009), seguindo uma classificação de acordo com a intensidade e percentagem de marcação por microscópio óptico com objetiva de 20x. Em caso de dúvida foi realizada a confirmação com objetiva de 40x. A imunoreação foi dividida em grupos de acordo com o percentual de intensidade de coloração positiva das células:

- 3+: Forte marcação, > 10% das células estavam marcadas;
- 2+: Moderada marcação, > 10% das células estavam marcadas;
- 1+: Fraca marcação, > de 10% das células estavam marcadas;
- 0: Nenhuma marcação ou marcação, < 10% das células estavam marcadas.

Sendo 3+ e 2+ considerados positivos e 1+ e 0 negativos. A análise foi realizada por todo o corte em cada estrutura celular por 2 observadores independentemente, sem conhecimento dos dados clínicos e histopatológicos. Seguiram-se ainda alguns critérios adicionais além do descrito acima como:

- Foi tomado como parâmetro para comparação os extremos de marcação mais e menos intensa de cada proteína individualmente, como também os controles positivos para se calibrar o escore anteriormente ao início da interpretação da marcação;

- No caso de marcação heterogênea biológica ou *borderline* se optou pela marcação mais intensa e representativa;
- Especificamente no grupo CE foi dado o escore correspondente a área do componente invasivo;
- Qualquer discrepância na determinação do escore foi imediatamente resolvido através de consenso entre os 2 observadores.

4.4.1 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão:

- Diagnóstico clínico de QA e CE confirmado com diagnóstico histopatológico;
- Pacientes que concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critérios de exclusão:

- Perda de tecido significativo durante o processamento que viesse a inviabilizar a análise da expressão das proteínas;
- Demais casos de biópsias de um mesmo paciente realizados posteriormente;
- Lesões localizadas em lábio superior;
- Material insuficiente para a pesquisa com os 4 anticorpos estudados.

4.5 Análise estatística

4.5.1 Análise dos dados

Os dados coletados dos 114 casos foram submetidos à análise estatística por meio do programa computacional: SPSS (for Windows, Rel. 17.0.0. 2008. Chicago: SPSS Inc). A estatística descritiva consistiu na construção de tabelas de frequência absoluta e relativa da expressão das proteínas baseados nos escores.

Para comparar os escores entre os três grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para cada proteína e como análise *post-hoc* o teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

Foi utilizada a correlação ordinal de Spearman para quantificar a relação entre a expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados nos grupos estudados de acordo com as estruturas celulares.

O nível de significância escolhido foi o valor convencional de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil da amostra

Entre os 14 pacientes do grupo Controle a média de idade foi 34 anos ($\pm 21,8$), sendo 7 do gênero masculino, 9 leucodermas, 2 melanodermas e 3 sem raça definida.

Entre os 50 pacientes do grupo QA, um caso não apresentava a idade na ficha do laudo histopatológico e a média de idade foi 57 anos ($\pm 14,5$). Foram 42 pacientes do gênero masculino, 46 leucodermas, 3 melanodermas e 1 xantoderma. Quanto à gradação do nível de atipia na QA, 4 (8%) apresentaram-se sem atipia, sendo 27 (54%) leves, 15 (30%) moderados e 4 (8%) graves. Segundo o risco da QA ter uma transformação maligna, 44 (88%) eram de baixo risco e 6 (12%) eram de alto risco. Verificou-se nas lesões de QA que os 4 casos sem atipia e 27 com atipia leve correspondiam as lesões de baixo risco, 12 casos com atipia moderada correspondiam as lesões de baixo risco, enquanto 3 casos correspondiam com as lesões de alto risco. Já os casos graves, 1 foi classificado de baixo risco e 3 como sendo de alto risco.

Entre os 50 pacientes do grupo CE de lábio, 4 pacientes apresentaram ausência da idade nos prontuários. A média de idade foi 64 anos ($\pm 13,1$), eram 43 pacientes do gênero masculino, 38 leucodermas, 1 melanoderma e 11 sem raça definida. Na classificação histopatológica quanto ao grau de diferenciação, 22 (44%) se apresentaram bem diferenciados, 20 (40%) moderadamente diferenciados, 4 (8%) pouco diferenciados e 4 (8%) superficialmente invasivos.

5.2 Expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares

A expressão de HER-1, pHER-1, HER-2 e pHER-2 em diferentes estruturas celulares foram avaliados em 114 casos por imunoistoquímica e houve variação de acordo com os grupos estudados.

A expressão de HER-1 foi considerada positiva na membrana em 77% (88/114) dos casos, dos quais tanto no grupo Controle quanto no grupo QA o escore predominante foi 2+ (50%), enquanto no CE o escore foi 3+ (44%). O HER-1 foi detectado no citoplasma em 61% (70/114) dos casos e o escore 2+ prevaleceu em todos os grupos. A reatividade do HER-1 no núcleo ocorreu somente em 1% (1/114) dos casos e apenas no grupo CE, 2% apresentaram o escore 2+ (Tabela 1 e Tabela 2 (Apêndice B)).

Tabela 1 - Distribuição relativa (%) da expressão de HER-1 nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares

HER-1 Membrana	Grupos			Total (n=114)
	Controle (n=14)	QA (n=50)	CE (n=50)	
Negativa	7	28	22	23
Positiva	93	72	78	77
Citoplasma				
Negativa	14	46	38	39
Positiva	86	54	62	61
Núcleo				
Negativa	100	100	98	99
Positiva	0	0	2	1
Total	100	100	100	100

O pHER-1 foi observado predominantemente no núcleo em 19% (22/114) dos casos, sendo encontrado em 7% dos casos na membrana e 3% no citoplasma (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição relativa (%) dos níveis de expressão de pHER-1 nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares

pHER-1	Grupos			Total (n=114)
	Controle (n=14)	QA (n=50)	CE (n=50)	
Membrana				
Negativa	93	96	90	93
Positiva	7	4	10	7
Citoplasma				
Negativa	93	100	96	97
Positiva	7	0	4	3
Núcleo				
Negativa	57	92	76	80,5
Positiva	43	8	24	19,5
Total	100	100	100	100

O HER-2 foi expresso na membrana em 25% (29/114) dos casos, 91% (104/114) no citoplasma e 4% (5/114) no núcleo, sendo a superexpressão mais expressiva no citoplasma em todos os grupos estudados (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição relativa (%) da expressão de HER-2 nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares

HER-2 Membrana	Grupos			Total (n=114)
	Controle (n=14)	QA (n=50)	CE (n=50)	
Negativa	57	80	74	75
Positiva	43	20	26	25
Citoplasma				
Negativa	0	8	12	9
Positiva	100	92	88	91
Núcleo				
Negativa	71	100	98	96
Positiva	29	0	2	4
Total	100	100	100	100

O pHER-2 foi encontrado no citoplasma em 69% dos casos e na membrana em 18% (Tabela 5). O escore predominante foi 0 na membrana em todas os grupos estudados e no citoplasma no grupo Controle. E 2+ foi mais prevalente no citoplasma nos grupos experimentais (Tabela 2 (Apêndice B)).

Tabela 5 - Distribuição relativa (%) dos níveis de expressão de pHER-2 nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares

pHER-2 Membrana	Grupos			Total (n=114)
	Controle (n=14)	QA (n=50)	CE (n=50)	
Negativa	78,5	100	66	82
Positiva	21,5	0	34	18
Citoplasma				
Negativa	78,5	30	18	31
Positiva	21,5	70	82	69
Total	100	100	100	100

5.3 Comparação da expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos de acordo com as estruturas celulares

A comparação dos valores da distribuição relativa dos níveis de expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis (os valores correspondentes as medianas, Q1 e Q3 estão descritos na Tabela 6 (Apêndice C) entre os grupos de acordo com a localização na membrana, citoplasma e núcleo (Tabela 7 (Apêndice D)). A partir deste dado foi efetuado a comparação entre pares de grupos através do teste de Mann-Whitney (Tabela 8 (Apêndice D)).

Houve uma diferença estatisticamente significativa de expressão do HER-1 total no citoplasma entre os grupos Controle e QA ($p=0,004$).

Houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de expressão de pHER-1 no citoplasma e no núcleo. No citoplasma a diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos Controle e QA ($p<0,001$) e entre os grupos Controle e CE ($p=0,010$). No núcleo a diferença foi estatisticamente significativa somente entre os grupos Controle e QA ($p=0,013$).

Houve diferença estatisticamente significativa de expressão de HER-2 no núcleo entre os grupos Controle e QA ($p=0,002$), e entre os grupos Controle e CE ($p=0,007$).

Houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de expressão de pHER-2 na membrana e citoplasma. Na membrana a diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos Controle e QA ($p=0,005$), e entre os grupos QA e CE ($p<0,001$). No citoplasma a diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos Controle e QA ($p<0,001$), e entre os grupos Controle e CE ($p<0,001$).

Para efeito de melhor visualização dos resultados, as distribuições relativas (%) dos níveis de expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados, que apresentaram diferença estatística significativa de acordo com a estrutura celular nos grupos estudados podem ser visualizadas a seguir na figura 7.

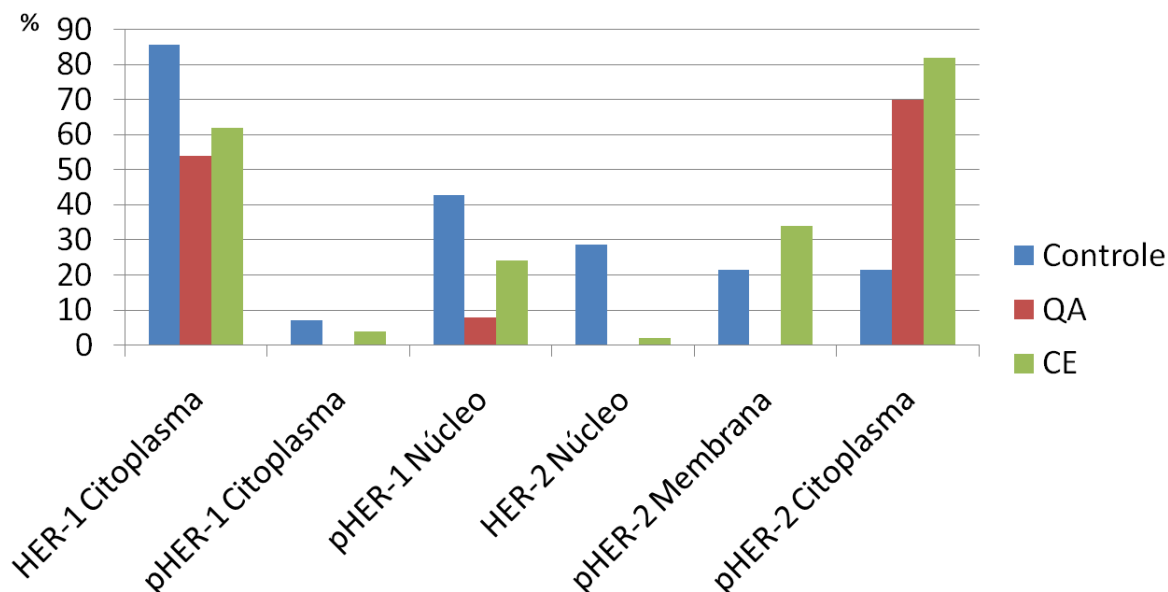


Figura 7 - Distribuição relativa (%) dos níveis de expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados que apresentaram diferença estatística significativa de acordo com a estrutura celular nos grupos Controle, QA e CE

5.4 Correlação da expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos de acordo com as estruturas celulares

A correlação da expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados foram estudadas entre os grupos de acordo com a localização na membrana, citoplasma e núcleo celular (Tabela 9 – Apêndice E).

5.4.1 Correlação da expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos na membrana

Houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão de HER-1 e os níveis de expressão de pHER-2 no grupo QA ($r=-0,306$, $p=0,031$).

Houve correlação estatisticamente significativa no grupo CE entre a expressão de HER-1 e HER-2 ($r=0,345$, $p=0,014$), a expressão de HER-1 e os níveis de expressão de pHER-1 ($r=0,431$, $p=0,002$) e a expressão de HER-2 e os níveis de expressão de pHER-1 ($r=0,318$, $p=0,025$) (Tabela 10).

5.4.2 Correlação da expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos no citoplasma

Houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão de HER-1 e HER-2 no grupo QA ($r=0,397$, $p=0,004$).

Houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão de HER-1 e HER-2 no grupo CE ($r=0,321$, $p=0,023$) (Tabela 10).

5.4.3 Correlação da expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos no núcleo

Houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão de HER-2 e os níveis de expressão de pHER-1 no grupo Controle ($r=0,735$, $p=0,003$) (Tabela 10).

Tabela 10 Resultado da correlação de Spearman (p-valor) entre HER-1 e HER-2 totais e fosforilados que apresentaram correlação estatisticamente significativa de acordo com a localização na membrana, citoplasma e núcleo nos grupos Controle, QA e CE

		Citoplasma		Membrana			Núcleo
		QA	CE	QA	CE		Controle
		HER-1	HER-1	HER-1	HER-1	HER-2	HER-2
HER-2	Coef. de correlação	0,397	0,321		0,345		
	p valor	0,004	0,023		0,014		
pHER-1	Coef. de correlação				0,431	0,318	0,735
	p valor				0,002	0,025	0,003
pHER-2	Coef. de correlação			-0,306			
	p valor			0,031			

5.5 Discrepâncias entre a expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados entre os grupos de acordo com a estrutura celular

As discrepâncias entre a expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados nos grupos estudados foram descritos abaixo (Tabela 11).

Tabela 11 - Discrepâncias entre HER-1 e HER-2 totais e fosforilados nos grupos Controle, QA e CE

Discrepâncias	Controle			QA			CE		
	N	M	C	N	M	C	N	M	C
HER-1 - / pHER-1 -	8	1	2	46	14	23	37	11	18
HER-1 + / pHER-1 -	0	12	11	0	34	27	1	34	30
HER-1 - / pHER-1 +	6	0	0	4	0	0	12	0	1
HER-1 + / pHER-1 +	0	1	1	0	2	0	0	5	1
HER-2 - / pHER-2 -	10	6	0	50	40	0	49	25	0
HER-2 + / pHER-2 -	4	5	11	0	10	15	1	8	9
HER-2 - / pHER-2 +	0	2	0	0	0	4	0	12	6
HER-2 + / pHER-2 +	0	1	3	0	0	31	0	5	35

(+): expressão positiva; (-): expressão negativa; N: núcleo; M: membrana;

C: citoplasma

Houve uma maior prevalência de casos HER-1 - / pHER-1 - no núcleo nos grupos Controle, QA e CE. Enquanto na membrana e no citoplasma nos grupos Controle, QA e CE prevaleceu HER-1 + / pHER-1 -.

Houve uma maior prevalência de casos HER-2 - / pHER-2 - no núcleo nos grupos Controle, QA e CE e na membrana nos grupos Controle, QA e CE. No citoplasma no grupo Controle prevaleceu HER-2 + / pHER-2 - , enquanto no citoplasma nos grupos QA e CE prevaleceram HER-2 + / pHER-2 +.

5.6 Análise descritiva

Foram observadas marcação na membrana, citoplasma e núcleo de todas as proteínas estudadas, exceto a marcação do núcleo com o pHER-2. Em todos os grupos, o HER-1 se expressou de forma mais intensa na camada basal do que nas outras camadas (Figura 8). As outras proteínas se expressaram em todas as camadas epiteliais. Em muitos casos a expressão se mostrou heterogênea no mesmo corte.

No grupo CE quando o corte apresentava área de mucosa normal adjacente ao CE, este se apresentava ora com expressão similar em intensidade, ora menor na maioria dos casos em todas as proteínas estudadas, tendo sido poucos os casos em que a mucosa normal adjacente ao CE se apresentava com maior expressão do que a área do CE propriamente dita.

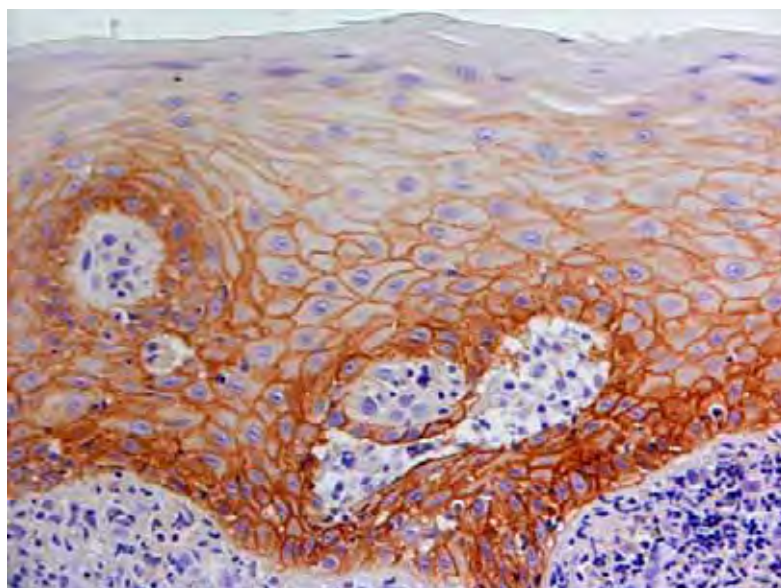


Figura 8 - Fotomicrografia com marcação imunoistoquímica da membrana e citoplasma pelo HER-1. Maior intensidade da expressão na camada basal do que nas outras camadas (Aumento original 200X).

A imunomarcação para HER-1, pHER-1, HER-2, pHER-2 nos grupos Controle, QA e CE podem ser visualizados na Figuras 9, 10 e 11 .

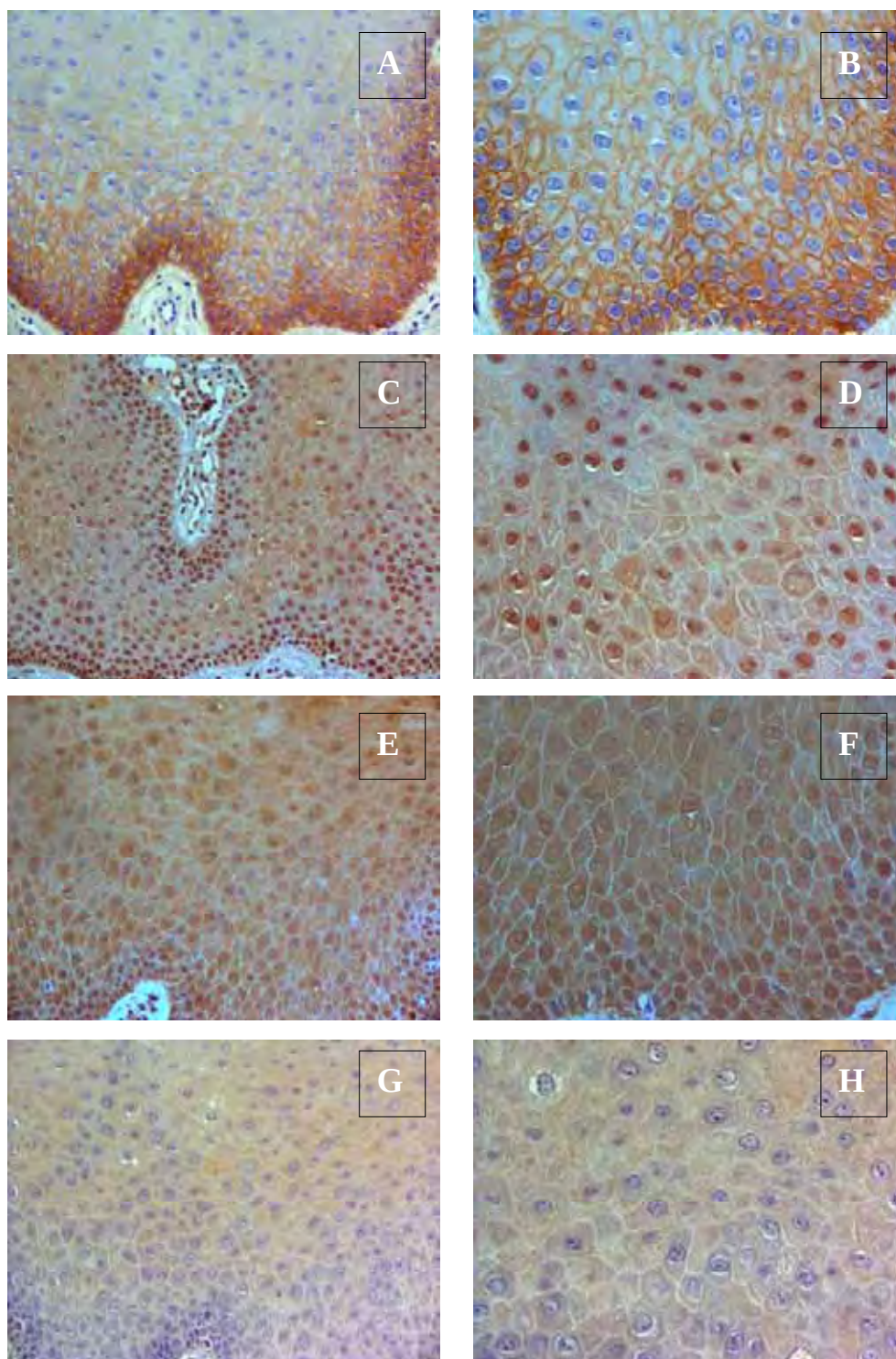


Figura 9 - Marcação imunoistoquímica representativa para HER-1, pHER-1, HER-2 e pHER-2 no grupo Controle. A) e B): expressão de HER-1 na membrana e citoplasma; C) e D): expressão de pHER-1 no citoplasma e núcleo; E) e F): expressão de HER-2 no citoplasma e núcleo; G) e H): ausência de expressão de pHER-2. (A; C; E; G: Aumento original 200X). (B; D; F; H: Aumento original 400X).

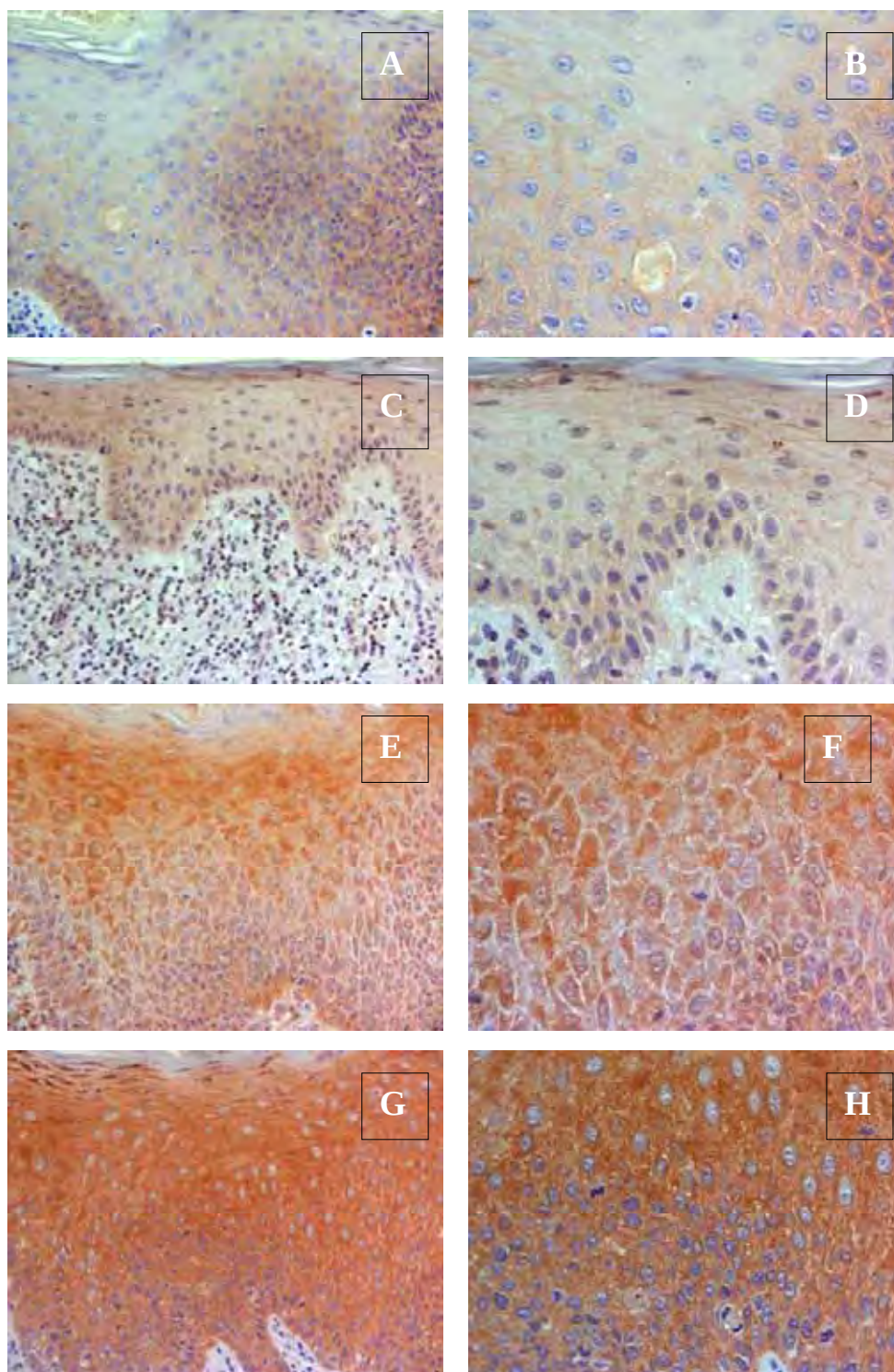


Figura 10 - Marcação imunoistoquímica representativa para HER-1, pHER-1, HER-2 e pHER-2 no grupo QA. A) e B): expressão de HER-1 na membrana e citoplasma; C) e D): expressão de pHER-1 na membrana; E) e F): expressão de HER-2 no citoplasma; G) e H): expressão de pHER-2 no citoplasma. (A; C; E; G: Aumento original 200X). (B; D; F; H: Aumento original 400X).

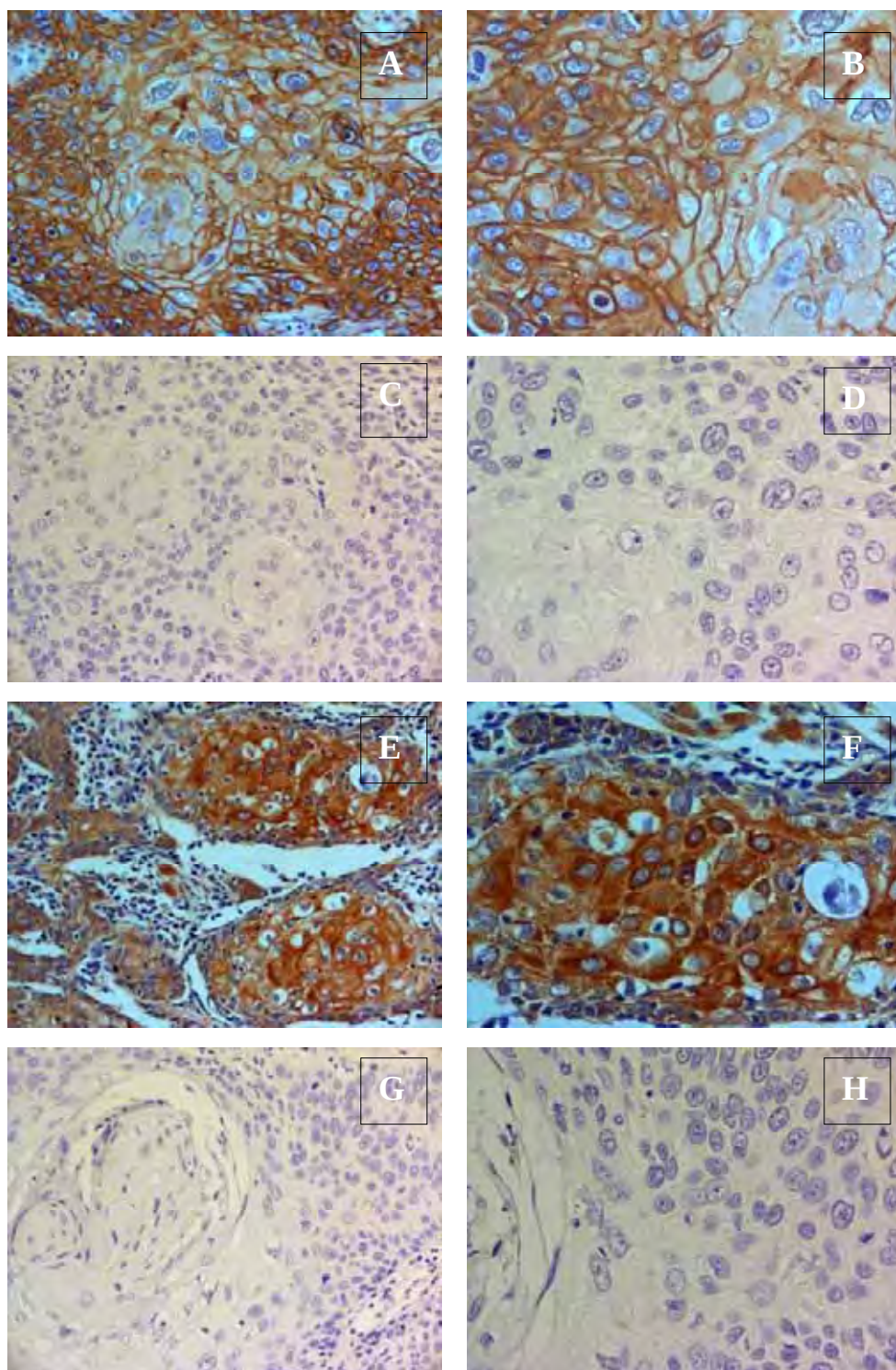


Figura 11 - Marcação imunohistoquímica representativa para HER-1, pHER-1, HER-2 e pHER-2 no grupo CE. A) e B): expressão de HER-1 na membrana e citoplasma; C) e D): ausência de expressão de pHER-1; E) e F): expressão de HER-2 na membrana e no citoplasma; G) e H): ausência de expressão de pHER-2. (A; C; E; G: Aumento original 200X). (B; D; F; H: Aumento original 400X).

6 DISCUSSÃO

Os receptores da família HER foram relacionados com a carcinogênese (Downward et al., 1984) por ter influência na diferenciação, metabolismo, organização citoesquelética (O-charoenrat et al., 2002), proliferação (O-charoenrat et al., 2002; Holbro et al., 2003), apoptose (Holbro et al., 2003), angiogênese e invasão (O-charoenrat et al., 2002).

A natureza e a intensidade das vias de sinalização oriundas do estímulo da família HER são importantes já que a partir do seu desencadeamento ocorrem essas respostas que podem levar ou não ao desenvolvimento de um carcinoma. As vias de sinalização dependem de uma diversidade de fatores como tipo de ligante (Normanno et al., 2006), disponibilidade do ligante (Rogers et al., 2005), abundância dos receptores (El Sheikh et al., 2004; Rogers et al., 2005), presença de receptores ativos (Rogers et al., 2005), composição do complexo receptor (Normanno et al., 2006) e determinantes estruturais específicos dos receptores (Normanno et al., 2006). Em nossa pesquisa o estudo dos ligantes não seria apropriado, porque a radiação UV e as vias de transativação relacionadas à família HER poderiam ativar os receptores de forma indireta e conseqüentemente a cascata. Por isso, optamos pela quantificação dos receptores, incluindo os fosforilados por oferecerem uma informação

biologicamente superior, ao invés de simplesmente informar a presença dos receptores na forma inativada (Thor et al., 2000).

A técnica para análise da expressão da família HER escolhido em nosso estudo foi a imunoistoquímica devido à amostra estar emblocada em parafina (Yasui et al., 1988). A vantagem da imunoistoquímica seria a facilidade da técnica e reduzido custo. A desvantagem dessa técnica é o risco de interpretação errônea levando a superestimação da reatividade do anticorpo, onde a maioria dos casos é referente mais a aneuploidia do que exatamente amplificação do gene. Outra razão para um equivocado aumento da reatividade seria nas situações onde a recuperação antigênica se excede (Saxby et al., 2005).

Há uma grande gama de fatores que influenciam e causam variabilidade sobre a interpretação da expressão da proteína como critérios de seleção de casos (Safran et al., 2001), fixação (Renshaw, 2007), tempo de armazenamento de lâminas com cortes (Jackson, 2007), escolha do anticorpo, técnica de recuperação antigênica adotada (Saxby et al., 2005), diferenças de metodologia, métodos de avaliação do escore utilizado na análise imunoistoquímica (Safran et al., 2001) e heterogenicidade da neoplasia (Koka et al., 2002).

Após a remoção do meio *in vivo*, o tecido sofre ações deletérias como hipóxia, ação de enzimas lisossômicas e alterações por decomposição. Havendo a necessidade de fixação rápida e apropriada da peça para evitar esses efeitos. A fixação causa alteração na conformação da estrutura terciária das proteínas, tornando-as

inativas biologicamente e alterando as propriedades químicas e antigênicas (Renshaw, 2007). Uma fixação pobre e o seu atraso causam perda da antigenicidade ou difusão dos antígenos ao redor do tecido. O excesso de fixação torna os antígenos alterados, mascarados, depletados ou destruídos. Não há nenhum fixador ideal para a demonstração de todos os antígenos. Dentre os mais variados tipos de substâncias de fixação o mais comumente utilizado anteriormente ao processo de emblocamento por parafina são os formaldeídos (Jackson, 2007), que oferecem uma boa preservação citológica, imunolocalização e mascara menos o antígeno. Embora, cause um aumento da hidrofobicidade tecidual, levando a uma maior incidência de marcação de fundo generalizada (Renshaw, 2007), isto é, todas as proteínas são hidrofóbicas em certo nível e a fixação aumenta a hidrofobicidade pela ligação reativa dos aminoácidos α e ϵ entre proteínas adjacentes ou dentro da estrutura terciária de uma única proteína. São especialmente propensos os tecidos conectivos, epitélio escamoso e adipócitos, sendo que tal aumento na hidrofobicidade é correlacionado à temperatura da fixação, duração e pH (Jackson, 2007). Em alguns casos de nossa amostra, o HER-2 teve uma marcação de fundo, não podendo afirmar se foi devido à fixação ou não. Ainda quando os espécimes são fixados em formaldeído ácido podem apresentar manchas oriundas de pigmentos de formalina (Renshaw, 2007).

As recomendações dadas pelo Colégio de Patologistas Americanos para ótimos resultados são espécimes de dimensões máximas de 1,0 X 1,0 X 0,4 cm, que devem ser fixados por no

mínimo de 3 h e meia e no máximo por 18 h em formaldeído tamponado neutro, preparados por período não maior do que 1 mês, e nos casos de aguardo para emblocamento deve-se armazenar em álcool a 70% (Jackson, 2007). Uma dificuldade que detectamos em nossa pesquisa foi a impossibilidade de controle sobre o processo de fixação da peça.

O tempo de armazenamento das lâminas dos cortes em parafina influencia na degradação de alguns antígenos, provavelmente devido à oxidação, por isso está indicado realizar os cortes semanalmente (Jackson, 2007). Nesta pesquisa não foi possível realizar os cortes na semana da reação imunoistoquímica, por isso não podemos afirmar que não houve perda de antigenicidade.

Quanto ao critério para a escolha dos anticorpos, a preferência foi pelos anticorpos monoclonais devido ao fato de se ligaram contra epítomos únicos. Mesmo assim há inconvenientes tanto com anticorpos monoclonais quanto policlonais, por serem propensas as ligações não específicas, o que exige a utilização de bons controles (Onley, 2007). Nesta pesquisa utilizamos apenas anticorpos monoclonais e controles positivos e negativos durante as reações.

Diferentemente dos anticorpos totais, os anticorpos fosforilados foram um desafio para serem encontrados comercialmente e reconhecidos na literatura, já que há poucos trabalhos publicados. E ainda, que os mesmos não demonstrassem reação cruzada com outros receptores da família HER.

Diferentes sítios de autofosforilação foram identificados para o HER-1: Tyr1068, 1148, 1173 (Downward et al., 1984), 992

(Walton et al., 1990) e 1086 (Hsuan et al., 1989). Utilizamos o anticorpo HER-1 que reconhecia Tyr 1173 e está envolvida na ativação da sinalização da MAPK. Para o HER-2 há cinco sítios de fosforilação, sendo defendido ser o sítio Tyr1248 mais funcional (Thor et al., 2000). Segundo Frogne et al. (2009), o Tyr1221/1222 seria melhor e mais sensível para análise imunoistoquímica do que o Tyr1248. Ambos desencadeiam a via Ras-Raf-MAPK envolvida na proliferação celular entre outras respostas celulares. Por tal razão utilizamos em nosso estudo o Tyr1221/1222 para verificar os níveis de expressão de pHER-2.

É necessário que os protocolos de imunoistoquímica sejam otimizados para cada anticorpo e para cada tipo de tecido a ser estudado, no entanto é uma fase que prolonga demasiadamente o andamento da pesquisa. Anticorpos primários devem ser otimizados em painéis de tecidos já conhecidos serem positivos e negativos para o antígeno em questão (Jackson, 2007). Nosso protocolo de otimização se baseou em tecidos com linhagens de células com expressão conhecida dos antígenos e esse conhecimento prévio foi obtido pela técnica de citometria de fluxo. Tal procedimento aumentou a confiabilidade das reações imunoistoquímicas, já que as expressões das proteínas coincidiram com dados anteriores.

Os efeitos da fixação com formaldeído mascarando os antígenos são reversíveis através do processo de recuperação antigênica, no qual envolve exposição dos cortes teciduais ao aquecimento ou digestão enzimática proteolítica. Os resultados da recuperação dependem da duração da fixação, do antígeno a ser

exposto, do tipo e das condições do processo de recuperação antigênica propriamente dito (Renshaw, 2007). Os métodos de recuperação antigênica otimizados neste estudo foram ácido cítrico em microondas e digestão enzimática pela proteinase K. Embora as lâminas estarem revestidas com adesivo, as condições severas de aquecimento para recuperação antigênica frequentemente causam desprendimento dos cortes, sendo que tecidos friáveis como os da mama são mais predispostos a esse efeito (Renshaw, 2007). Em nossa amostra tivemos alguns casos com desprendimento parciais dos cortes, sendo analisados somente as áreas e os casos viáveis.

Há vários tipos de métodos de análise da expressão de proteínas baseado em escore para determinar a extensão e a intensidade da marcação citados na literatura (Xia et al., 1999; Wiseman et al., 2005; Nieto et al., 2007; Grivas et al., 2007; Magkou et al., 2008). O escolhido foi baseado e adaptado a partir do método do Herceptest (DAKO) e de marcação global descrito por Frogne et al., (2009). Esta opção foi devido a maior adequação quanto as diferentes estruturas celulares marcadas, termos utilizado os mesmos anticorpos fosforilados, bem como o valor de corte aproximado de 10% que facilitou a análise.

Em relação aos resultados obtidos, os perfis dos pacientes do grupo QA foram similares aos de um estudo nosso no qual a maioria da amostra era do gênero masculino, acima dos 40 anos e leucodermas (Cavalcante et al., 2008).

A QA em relação à faixa etária também foi observada em pessoas jovens entre os 20 e 30 anos (Girard et al., 1980), apesar

da média de idade de nossos pacientes ser 57 anos. Sabe-se que pacientes com idade mais avançada apresentam maior susceptibilidade a desenvolver a lesão já que possuem uma diminuição do *turnover* epidermal, menor resposta inflamatória frente à radiação UV e função imune prejudicada (Pillai et al., 2005).

Deve-se enfatizar que apesar da QA e CE de lábio inferior afetarem na grande maioria pacientes leucodermas, os pacientes melanodermas também podem se apresentar comprometidos com ambas as lesões como ocorreu em nosso estudo, mas logicamente com uma menor incidência.

É relatada uma proporção de 10:1 de lesões de QA acometendo lábio inferior comparativamente com lábio superior (Scheinberg, 1992). Não possuímos esse dado de proporção relacionado à localização, pois incluímos em nossa amostra somente as lesões localizadas no lábio inferior devido à padronização desta localização para o estudo comparativo tanto de QA quanto de CE. Já que os casos de CE em lábio inferior e superior apresentam recorrência e prognóstico distintos (Eisen; Lynch, 1998; Neville et al., 1998), impossibilitando uma análise mais fidedigna.

O grau de atipia mais encontrado de QA neste estudo foi do tipo leve (54%) e moderado (30%), com menos prevalência os graves (8%) e sem atipia (8%). Em estudo anterior feito pelo nosso grupo (Cavalcante et al., 2008), a atipia grave tinha sido mais prevalente. Demonstrando que não há um padrão no perfil dos pacientes que procuram atendimento em nosso serviço ou uma das explicações para esta diferença pode ser referente à subjetividade na

classificação do grau de atipia no momento do diagnóstico histopatológico.

Há outras situações que podem influenciar na classificação do nível da atipia: a) falta de correspondência clínica e histopatológica (Manganaro et al., 1997). Por exemplo, podemos realizar a biópsia numa localidade mais expressiva clinicamente, porém que pode não corresponder à área de pior aspecto histologicamente; b) o diagnóstico da biópsia incisional pode não corresponder com a da biópsia excisional. Nico et al. (2007) compararam os achados histopatológicos da biópsia incisional seguida da vermelhectomia e houve 50% de coincidência, 40% revelaram menos alterações histopatológicas na biópsia do que na vermelhectomia e 10% ao contrário. A fim de se evitar uma subestimação da gravidade da lesão e instituição de um tratamento inadequado, sugere-se realizar mais de uma biópsia incisional e nos casos de vermelhectomia, o exame minucioso de todo o espécime deve ser feito através de cortes seriados.

Outro tipo de classificação de atipia epitelial foi proposto por Kujan et al., (2006) baseado nos mesmos critérios de arquitetura e citológicos da classificação da OMS (2005), porém em um sistema de gradação binário ao invés de múltiplo. Este sistema é em forma de categorias (baixo e alto risco) sendo defendido pelos autores como de maior valor prognóstico devido a sua sensibilidade e especificidade, auxiliando o clínico nas decisões terapêuticas das displasias. Optamos pela obtenção dos dois tipos de classificações em nosso estudo para fins comparativos com a literatura. Foi observado

que todos os casos de QA sem atipia, atipia de grau leve e a maioria dos casos de grau moderado se encaixavam na categoria de lesões de baixo risco e as de atipia grave nas lesões de alto risco. Segundo os autores acima, os casos classificados como de alto risco apresentariam uma maior probabilidade de transformação maligna, incluindo os casos classificados como graves e também os moderados. Ainda concluem que esse sistema de graduação binário auxiliaria os clínicos, principalmente nas decisões relativas aos casos de displasia moderada.

A probabilidade de transformação de QA para CE na literatura ainda é incerta. Há relatos de valores acima de 10% dos casos (Eisen; Lynch, 1998) e em torno de 16,9% (Marcopoulos et al. 2004). Em nossos casos com diagnóstico apenas de QA e que são preservados há aproximadamente dez anos, não houve evolução para CE. O uso de FPS e acompanhamento efetivo mantém o quadro clínico de QA inalterado. Esse procedimento não reverte às alterações displásicas no epitélio, mas mantém o quadro estável (Main; Pavone, 1994). Houve casos com diagnóstico de QA que apresentavam CE superficialmente invasivo. Condição que não caracteriza evolução já que não conseguimos precisar o momento de transformação maligna, além do fato que estas lesões podem ocorrer concomitantemente e não necessariamente ser uma evolução da outra.

CE de lábio inferior geralmente são bem diferenciados e quando ocorre metástase, é tardiamente (Sapp et al., 1997). A amostra estudada de CE em lábio inferior foi de casos bem diferenciados (44%) na grande maioria. Quanto à metástase e sobrevida não pudemos trabalhar com essas informações, porque os indivíduos

foram tratados em hospitais diversos, o que dificultou o acesso a esses dados.

Em relação à expressão de HER-1 e HER-2 totais foi previamente demonstrada superexpressão em CE de cabeça e pescoço por alguns autores (Santini et al., 1991; Grandis; Tweardy, 1993; Shin et al., 1994; Grandis et al., 1996; Wilkman et al., 1998; Hiraishi et al., 2006). Kilpi et al. (1996) avaliaram casos de líquen plano oral que evoluíram para alterações displásicas e CE associado, displasia e CE sem líquen plano. Tiveram como resultados que o HER-2 não foi expresso em tecidos de pacientes com líquen plano e evolução para displasia, porém foi expresso na displasia e CE sem líquen plano e no tecido normal. Rautava et al (2008) encontraram marcação na amostra de displasia e CE oral. Esta marcação ocorreu no epitélio oral normal e houve grande variação na expressão do HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4. Os autores afirmaram ainda que o HER-4 foi translocado para o núcleo da célula e justificaram seus resultados à heterogenicidade estrutural e genética destas lesões.

Encontramos em nosso estudo uma maior marcação estatisticamente significativa no grupo Controle localizado no citoplasma do HER-1 e do pHER-1; no núcleo do pHER-1 e do HER-2 do que nos grupos QA e CE. Houve exceção do pHER-2 na membrana e no citoplasma. Uma hipótese para esse achado pode ser devido ao grupo ser composto por uma variedade de lesões benignas localizadas no vermelhão do lábio, incluindo processos inflamatórios e neoplasias benignas que podem também apresentar proliferação aumentada. A explicação para a expressão variada das proteínas HER-

1 e HER-2 fosforiladas nas lesões estudadas pode ser devido a maior ou menor exposição à radiação UV, já que esta atua indiretamente na ativação destas proteínas e não temos como precisar exatamente quais dos pacientes teve ou não maior exposição à radiação na época em que foi realizada a biópsia.

Em nossas análises HER-1, pHER-1 e HER-2 foram expressas na membrana, citoplasma e núcleo, sendo raras no núcleo com o HER-1, esporádicas com o HER-2 e em maior ocorrência com o pHER-1. O pHER-2 não apresentou expressão localizada no núcleo das células. A localização da família HER descrita na literatura é mais relatada na membrana (Xia et al., 1999; Ibrahim et al., 1999; Bei et al., 2001; Mrhalova et al., 2003; Ekberg et al., 2005) e citoplasma (Xia et al., 1999; Ibrahim et al., 1999; Bei et al., 2001; Ekberg et al., 2005). Segundo Xia et al. (1999), a significância da marcação no citoplasma não é clara, porém acredita-se que seja uma marcação específica. A localização nuclear vem sendo observada com explicações biológicas descritas a seguir. O HER-1 localizado no núcleo é associado com uma alta proliferação de tecidos. A localização nuclear atuaria como fator de transcrição ou coativador e, consequentemente ativaria genes importantes no processo mitogênico. Ainda não está totalmente claro de como o HER-1 poderia ser translocado para o núcleo, sendo uma hipótese sugerida através do sistema de importação nuclear convencional associado ao complexo de poro nuclear (via Ran/Importin) (Lin et al., 2001). Outra possibilidade é de que a desregulação dos ligantes do HER-1 levaria o receptor para o núcleo mediado pela SFK. Outra função descrita para

o HER-1 localizado no núcleo seria de atuar na fosforilação do PCNA na tirosina 211 (Li et al., 2009). Xia et al. (1997) afirmaram que o HER-1 e o HER-2 poderiam atuar não somente como receptores associados à membrana, mas também capazes de realizar outras funções ainda desconhecidas dentro e até mesmo fora da célula.

Grivas et al. (2007) ao utilizarem os anticorpos HER-3 e pHER-3 (Tyr1289) em seu estudo, encontraram marcação citoplasmática e nuclear, ocorrendo a marcação nuclear na mucosa normal adjacente, adenomas e carcinomas coloretais. A explicação dada pelos autores a esta variada marcação da célula seria devido aos diferentes papéis do HER-3 em diferentes tecidos e estágios entre o normal e a neoplasia. Não houve correlação entre a expressão de HER-3 e pHER-3, sugerindo que a fosforilação do HER-3 pode ser independente dos níveis de HER-3 total tanto no núcleo quanto no citoplasma. Nesse estudo a correlação entre a expressão das proteínas HER-1 e HER-2 totais e fosforiladas apresentaram coeficientes de correlação não nulos. Embora os valores tenham demonstrado uma correlação fraca na maioria dos resultados, com exceção do HER-2 e pHER-1 no grupo Controle.

Utilizamos os mesmos anticorpos que Frogne et al. (2009) em sua análise de câncer de mama. Esta pesquisa evidenciou expressão de pHER-1 (Tyr1173) na membrana, de pHER-2 (1221/1222) na membrana e citoplasma e de pHER-3 (Tyr1289) na membrana, citoplasma e núcleo. 10% dos casos apresentavam marcação nuclear substancial. Entre todos os casos que esses autores estudaram 61% não apresentavam expressão de HER-2, porém

apresentavam positividade para pHER-2. Destes 82% dos casos tiveram forte expressão de pHER-2 e concomitante expressão de pHER-1 e pHER-3. Esses dados dão suporte de que o HER-2 possa ser ativado via dimerização com um outro membro da família HER e que pHER-2 foi um marcador de pobre prognóstico independente do HER-2.

Nieto et al., (2007) mostraram falta de correlação em câncer de mama avançado entre HER-1 e pHER-1 (Tyr 1086). Magkou et al. (2008) também encontraram maior positividade de pHER-1 (Tyr1173) (35,7%) do que HER-1 (11,3%) na membrana de células tumorais de carcinoma de mama invasivo. Sendo atribuído maior positividade para os casos pHER-1 do que para HER-1 devido ao processo de diminuição de HER-1. Uma vez ativado, o HER-1 internaliza, diminuindo a ligação da membrana do HER-1 não ativado (Waterman; Yarden, 2001). Além disso, ainda há os casos de mutação que faz com que o receptor fosforile ativamente as tirosinas (Kutchai, 2004), podendo assim ocorrer maior expressão dos receptores fosforilados do que dos totais. Nesta pesquisa encontramos poucos casos com discrepância entre a expressão negativa da proteína total e positiva da fosforilada. Pode ocorrer expressão positiva da proteína total e negativa da proteína fosforilada. Verificamos mais casos com esse último perfil, retratando uma real situação de presença de proteínas totais, entretanto não da forma ativada. Thor et al. (2000) consideram que isso pode ocorrer também pela falta de reconhecimento das outras formas ativadas do receptor, decorrente da utilização de um anticorpo específico que se liga a um único sítio

(Tyr1173). Em razão disso pode ocorrer restrição quanto aos resultados, já que não engloba todos os sítios.

Um estudo de câncer de mama no qual foi avaliado imunoistoquimicamente a expressão de HER-2 e a forma ativa referente ao sítio Tyr 1248, os investigadores observaram que os casos com baixa expressão de HER-2 e pHER-2 negativos tiveram características e resultados biológicos similares aos casos HER-2 negativos. Já aqueles com superexpressão de HER-2 ou positividade de pHER-2 foram associados a um pior prognóstico e mais fatores biológicos adversos. Logo, consideraram que a positividade do pHER-2 poderia substituir a superexpressão do HER-2 (Thor et al., 2000). Este estudo demonstrou que a falta de dados referentes à evolução dos casos de CE, a ocorrência de metástase e a informação da sobrevivência dos pacientes dificultou a avaliação do valor prognóstico dos receptores na forma inativa ou ativa.

A localização nas camadas celulares para a família HER parece não apresentar um padrão. Shin et al. (1994) observaram variação da localização nas camadas de acordo com a área do CE de cabeça e pescoço. O HER-1 encontrava-se na camada basal no epitélio normal, enquanto no epitélio normal adjacente ao CE estendia-se para camadas parabasais e expandiu-se gradualmente da camada basal para todas as camadas, inclusive as superficiais nas hiperplasias, displasias e CE. Wilkman et al. (1998) relataram uma forte imunomarcagem com o HER-2 nas camadas basais e em áreas de invasão. Bei et al. (2001) verificaram expressão do HER-1 individualmente nas camadas basal e intermediária no CE oral. Co-expressão do HER-1 com HER-4 foi

confinado na camada basal, enquanto co-expressão de 3 ou 4 receptores da família HER ocorreram apenas na camada intermediária. Em nossa amostra o HER-1 foi encontrado em todos os grupos de forma mais intensa na camada basal do que nas outras camadas. As outras proteínas foram expressas em todas as camadas epiteliais.

Insucesso quanto aos resultados da utilização de drogas inibidoras baseadas especificamente em um membro da família HER existem, porque nem todos os pacientes respondem ao tratamento (Colbleigh et al., 1999). Uma das possíveis causas de resultados parciais com estas drogas pode ser devido à heterodimerização dos receptores (Olayioye et al., 2000), bem como abundante interação com outras moléculas da cascata de sinalização tanto intra quanto extracelularmente (Rogers et al., 2005). Faz-se necessários maiores estudos envolvendo os membros da família HER, principalmente os fosforilados a fim de se verificar a co-expressão em diferentes neoplasias auxiliando na resolução da resistência as drogas inibidoras.

De acordo com nossos resultados, ainda não podemos considerar o HER-1 e HER-2 totais e fosforilados como marcadores de diagnóstico, transformação ou progressão e de prognóstico em lesões de QA e CE. Isso porque obtivemos expressões variadas, sem seguir uma tendência esperada de diminuição ou aumento da expressão nos grupos a partir do grupo Controle. Mais pesquisas precisam ser realizadas com essas proteínas para se ter um melhor entendimento do papel das mesmas nestas lesões.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e achados desta pesquisa, pode-se concluir que:

- A maior expressão das proteínas HER-1 e HER-2, na forma total ou fosforilada, no grupo Controle pode ser devido à variedade de lesões benignas que compõem este grupo e que podem apresentar proliferação aumentada;
- As proteínas HER-1 e HER-2, na forma total ou fosforilada, localizadas no núcleo devem possuir outras funções além de iniciadores de cascatas intracelulares, possivelmente como fatores de transcrição e/ou estabilizadores/formadores de complexos nucleares contendo os mesmos para potencializar a transcrição;
- As fosforilações dos receptores HER-1 e HER-2 desencadeando a via das MAPK podem ser independentes dos níveis totais das proteínas nos grupos Controle, QA e CE labial, já que a fosforilação pode estar aumentada indiretamente devido a radiação UV de uma forma independente de ligantes;

- As proteínas HER-1 e HER-2 podem atuar como parceiros na formação de heterodímeros nas lesões estudadas.

8 REFERÊNCIAS*

Albuquerque Júnior, RLC, Miguel MCC, Costa ALL, Souza LB. Correlation of c-erb-B-2 and S-100 expression with the malignancy grading and anatomical site in bucal squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol*. 2003;84(6): 259-65.

Ayres S. Chronic actinic cheilitis. *J Am Med Assoc*. 1923;81(14):483-6.

Banóczy J, Csiba A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod*. 1976;42(6):766-74.

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

Bentley JM, Barankin B, Lauzon GJ. Paying more than lip service to lip lesions. *Can Fam Physician*. 2003;49:1111-6.

Berking C, Takemoto R, Binder RL, Hartman SM, Ruiter DJ, Gallagher PM, et al. Photocarcinogenesis in human adult skin grafts. *Carcinogenesis*. 2002;23(1):181-7.

* Baseado em:

International Comité of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM:c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 de ago.] Disponível em:http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Berking C, Herzinger T, Flaig MJ, Brenner M, Borelli C, Degitz K. The efficacy of photodynamic therapy in actinic cheilitis of the lower lip: a prospective study of 15 patients. *Dermatol Surg.* 2007;133(7):825-30.

Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2000;16(6):239-44.

Bianchi S, Palli D, Falchetti M, Saieva C, Masala G, Mancini B et al. ErbB receptors expression and survival in breast carcinoma: a 15 year follow-up study. *J Cell Physiol.* 2006;206(3):702-8.

Blomgren I, Blomqvist G, Lauritzen C, Lilja J, Peterson LE, Holmstrom H. The step technique for the reconstruction of lower lip defects after cancer resection. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1988;22(1):103-11.

Bork K, Hoide N, Korting GW, Burgdorf WHC, Young SK. Diseases of the bucal mucosa and the lips. In: Bork K, Hoide N, Korting GW, Burgdorf WHC, Young SK. *Malignant Tumors.* Germany: WB Saunders; 1993. p. 326-8.

Brightman VJ. Red and White lesions of the bucal mucosa. In: Lynch MA, Brightman VJ, Greenberg MS. *Burkit's bucal medicine diagnosis and treatment.* Philadelphia: JB Lippincott Company; 1994. p.96-7.

Carpenter G. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol.* 1999;146(4):697-702.

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

Cavalcante, A. S. R. Queilite actínica: estudo clínico e metodológico. [Tese-Livre docência em Semiologia]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP), Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2000.

Cavalcante ASR, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(3):498-503.

Chen J, Katz RV, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lip cancer. *Cancer.* 1992;70(8):2025-30.

Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and dumb: the biology of ErbB2 and ErbB3. *Exp Cell Res.* 2003;284(1):54-65.

Clydesdale GJ, Dandie GW, Muller HK. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol.* 2001;79(6):547-68.

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER-2 monoclonal antibody in women who have HER-2 overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*. 1999;17(9):2639-48.

Culouscou JM, Plowman GD, Carlton GW, Green JM, Shoyab M. Characterization of a breast cancer cell differentiation factor that specifically activates the HER-4/p180erbB4 receptor. *J Biol Chem*. 1993;268(25):18407-410.

Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science*. 1997;277(5332):1630-5.

Douglass CW, Gammon MD: Reassessing the epidemiology of lip cancer. *Bucal Surg*. 1984;57(6):631-42.

Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, STOCKWELL P, et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences. *Nature*. 1984;307(5951):521-7.

Eisen D, Lynch DP. Benign, Premalignant and malignant lesions. In: _____. *The mouth: diagnosis and treatment*. Missouri: Mosby; 1998. p.73-9.

Ekberg T, Nestor M, Engstrom M, Nordgren H, Wester K, Carlsson J et al. Expression of EGFR, HER-2, HER-3, and HER-4 in metastatic squamous cell carcinomas of the bucal cavity and base of tongue. *Int J Oncol*. 2005;26(5):1177-1185.

El Sheikh SS, Domin J, Abel P, Stamp G, Lalani E. Phosphorylation of both EGFR and ErbB2 is a reliable predictor of prostate cancer cell proliferation in response to EGF. *Neoplasia*. 2004;6(6):846-53.

Esteva FJ, Hortobagyi GN, Sahin AA, Smith TL, Chin DM, Liang SY, et al. Expression of erbB/HER receptors, heregulin and p38 in primary breast cancer using quantitative immunohistochemistry. *Oncol Res*. 2001;7(3):171-7.

Fernández-Ángel I, Rodriguez-Archilla A, Cachaza J A, Medina MM, Ortega SS. Markers of metastasis in lip cancer. *Eur J Dermatol*. 2003;13(3):276-9.

Frogne T, Laenkholm AV, Lyng MB, Henriksen KL, Lykkesfeldt AE. Determination of HER-2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors. *Breast Cancer Res*. 2009;11(1):R11.

Galvão Filho. Dicionário odonto-médico. São Paulo: Santos; 1998. p.952.

Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol cell*. 2003;11(2):495-505.

Girard KR, Hoffman BL, Viejo M. Actinic cheilitis: report of a case. *Bucal Surg Bucal Med Bucal Radiol Endod*. 1980;50(1):21-4.

Gooris PJ, Vermey B, de Visscher JG, Roodenburg JL. Frozen section examination of the margins for resection of squamous cell carcinoma of the lower lip. *J Bucal Maxillofac Surg*. 2003;61(8):890-94.

Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming Growth Factor- α and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res*. 1993;53(15): 3579-84.

Grandis JR, Tweardy DJ. TGF- α and EGFR in head and neck cancer. *J Cell Biochem Suppl*. 1993;17F:188-91.

Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 1996;78(6): 1284-92.

Graus-Porta D, Beerli R, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*. 1997; 16(7):1647-55.

Grivas PD, Antonacopoulou A, Tzelepi V, Sotiropoulou-Bonikou G, Kefalopoulou Z, Papavassiliou AG et al. HER-3 in colorectal tumourigenesis: from mRNA levels through protein status to clinicopathologic relationships. *Eur J Cancer*. 2007;43(17):2602-11.

Half E, Broaddus R, Danenberg KD, Danenberg PV, Ayers GD, Sinigrope FA. HER-2 receptor expression, localization and activation in colorectal cancer cell lines and human tumors. *Int J Cancer*. 2004;108(4):540-48.

Hart PH, Grimbaldston MA, Finlay-Jones JJ. Sunlight, immunosuppression and skin cancer: role of histamine and mast cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28(1): 1-8.

Hiraishi Y, Wada T, Nakatami K, Negoro K, Fujita S. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in bucal squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2006;12(2):87-91.

Hjortdal O, Berner A. Squamous cell carcinomas of the lower lip. *J Cranio maxillofac surg*. 1995; 23(1):34-37.

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

Hsuan JJ, Totty N, Waterfield. Identification of a novel autophosphorylation site (P4) on the epidermal growth factor receptor. *Biochem J.* 1989;262(2):659-63.

Huang RP, Adamson ED. A biological role for Egfr-1 in cell survival following ultra-violet irradiation. *Oncogene.* 1995;10(3):467-75.

Huang RP, Wu JX, Fan Y, Adamson ED. UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J Cell Biol.* 1996;133(1):211-20.

Ibrahim SO, Lillehaug JR, Johannessen AC, Liavaag PG, Nilsen R, Vasstrand EN. Expression of biomarkers (p53, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-erbB2/neu and the proliferative cell nuclear antigen) in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 1999;35(3): 302-13.

Ibsen OAC, Phelan JA. Bucal pathology for the dental higienist. In: Ibsen OAC, Phelan JA. *Neoplasia*. Philadelphia: W B Saunders, 1996. p. 277-81.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2010: incidencia de cancer no Brasil. Instituto do câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, Kitamura K, Ohshima M, Asano K. Gene amplification and overexpression of EGFR in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer*. 1989;59(4):559-62.

Jackson P. Quality assurance in immunochemistry. In: Renshaw S. *Immunohistochemistry*. Bloxham:Scion; 2007. p.205-37.

Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, MacDonald DG et al. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World health organization classification of tumours: pathology & genetics head and Neck tumours*. Lyon: IARC Press; 2005. p.168-75.

Kaugars G, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM . Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Bucal Surg Bucal Med Bucal Pathol Bucal Radiol and Endod*. 1999;88(2):181-6.

Kilpi A, Rich AM, Donttinem YT, Reade PC. Expression of c-erbB2 protein in keratinocytes of oral mucosa lichen planus and subsequent squamous cell carcinoma. *Eur J Oral Sci*. 1996;104(3):278-84.

Knebel A, Rahmsdorf HJ, Ulrich A, Herrlich P. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J*. 1996;15(19):5314-25.

Koka V, Potti A, Koch M, Fraiman G, Mehdi S, Levitt R. Role of immunohistochemical identification of HER-2/neu and detection of variability in overexpression in pancreatic carcinoma. *Anticancer res.* 2002;22(3):1593-97.

Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006; 42(10):987-93.

Kutchai HC. Receptores de membrana, segundo mensageiros e vias de transdução de sinais. In: Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p.65-82.

Laskaris G. Atlas colorido de doenças da boca. In: Laskaris G. *Neoplasias malignas*. São Paulo: Artes Médicas; 2004. p. 328.

Laws MRA, Joseph MAJ, Wide L, Grabski WJ. Surgical pearl: Scroll-shaped electrode for eletrodesiccation of actinic cheilitis. *J Am Acad Dermatol.* 2000;42(5Pt1): 827-8.

Lax I, Howk JR, SapJ, Bellot F, Winkler M, Ullrich A et al. Chicken epidermal growth factor (EGF) receptor: cDNA cloning, expression in mouse cells, and differential binding of EGF and transforming growth factor alpha. *Mol Cell Biol.* 1988;8(5):1970-8.

Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam HK, Park WS, Nam SW et al. Somatic Mutations of EGFR gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2005;11(8): 2879-82.

Lemoine NR, Jain S, Silvestre F, Lopes C, Hughes CM, Mclelland E et al. Amplification and overpression of the EGF receptor and c-erb-B2 proto-oncogenes in human stomach cancer. *Br J Cancer.* 1991;64(1):79-83.

Lewis S, Locker A, Todd JH, Bell JA, Nicholson R, Elston CW et al. Expression of epidermal growth factor receptor in breast carcinoma. *J Clin Pathol.* 1990;43(5):385-9.

Li C, Iida M, Dunn E, Ghia A, Wheeler D. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene.* 2009;28(4):3801-13.

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcriptional factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3(9):802-8.

Lindqvist C. Risk factors of lip cancer: a critical evaluation based on epidemiological comparisons. *Am J Public Health.* 1979;69(3):256-60.

Lundeen RC, Langlais RP, Terezhalmay GT: Sunscreen protection for lip mucosa: a review and update. *J Am Dent Assoc.* 1985;111(4):617-2.

Magkou C, Nakopoulou L, Zoubouli C, Karali K, Theohari I, Bakarakos P, et al. Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the phosphorylated EGFR in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R49.

Main JHP, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc.* 1994;60(2):113-16.

Manganaro AM, Will MJ, Poulos E. Actinic cheilitis: a premalignant condition. *Gen Dent.* 1997;45(5):492-4.

Mariezkurrena XA, Guimera JA, Rodriguez JW, Weisman R, Ongkeko W. Estudio por inmunohistoquímica de la expresión de EGFR en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2005;56(4):143-6.

Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Bucal Dis.* 2004;10(4):212-6.

Menard S, Fortis S, Castiglioni F, Agresti R, Balsari A. HER-2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncol.* 2001;61(suppl 2):62-72.

Melnikova VO, Ananthaswamy HN. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat Res.* 2005;571(1-2):91-106.

Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Bucal Dis* 1999;5(3):185-95.

Mrhalova M, Kodet R, Kalinova M, Hilska I. Relative quantification of ErbB2 mRNA in invasive duct carcinoma of breast: correlation with ErbB2 protein expression and ErbB2 gene copy number. *Pathol.* 2003;199(7): 453-61.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Epitelial*. In: _____. *Patologia bucal e maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.286-96.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Epitelial*. In: _____. *Patologia oral e maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.304-72.

Nico MMS, Silva EAR, Lourenço V. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol.* 2007;34:309-14.

Nieto Y, Nawaz F, Jones RB, Shpall EJ, Nawaz S. Prognostic significance of overexpression and phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and the presence of truncated EGFRvIII in locoregionally advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(28):4405-13.

Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 2006;366(1):2-16.

O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Archer DJ, Eccles SA. C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors. *Oral Oncol.* 2002a;38(1):73-80.

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

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The erbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000;19(13):3159-67.

Onley C. Antibodies for immunochemistry. In: Renshaw S. *Immunohistochemistry*. Bloxham:Scion; 2007. p.3-31.

Ouhtit A, Gorny HK, Muller LL, Hill L, Owen-Schaub L, Ananthaswamy HN. Loss of Fas-ligand expression in mouse keratinocytes during UV carcinogenesis. *AM J Pathol.* 2000;157(6):1975-81.

Orenstein A, Godan O, Weissman O, Winkler E, Haik J. A new modality in the treatment of actinic cheilitis using the Er: Yag Laser. *J Cosmet Laser Ther.* 2007;9(1):23-5.

Parise Júnior, O, Carvalho LV, Miguel REV, Kowalski LP. Prognostic impact of p53, c-erbB2 and epidermal growth factor receptor on head and neck carcinoma. *São Paulo Med J.* 2004;122(6):264-8.

Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 1996;13(1): 63-72.

Picascia DD, Robinson JK. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 1987;17(2pt1):255-64.

Pimentel DRN, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic cheilitis: histopathology and p53. *J Cutan Pathol*. 2006;33(8):539-44.

Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation-a review. *Int J Cosmet Sci*. 2005;27(1):17-34.

Pindborg JJ. Histological typing of cancer and precancer of the bucal mucosa. In: _____. Berlin: Springer, 1997. p.21-31.

Prigent SA, Gullick WJ. Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *EMBO J*. 1994;13(12):2831-41.

Quinn AG. Ultraviolet radiation and skin carcinogenesis. *Br J Hosp Med*. 1997;58(6):261-4.

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

Rautava J, Jee KJ, Miettinen PJ, Nagy B, Myllykangas S, Odell EW et al. ErbB receptors in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Oral Oncol.* 2008;44(3):227-35.

Regezi J, Sciubba JJ. Condições Ulcerativas. In: _____. *Patologia bucal: correlações clinicopatológicas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.62-72.

Reichart PA, Philipsen HP. Lábios. In: _____. *Atlas colorido de patologia bucal.* Porto Alegre: Artes Médicas; 2000. p.54-55.

Renshaw S. Immunochemical staining techniques. In: _____. *Immunohistochemistry.* Bloxham: Scion; 2007. p.45-95.

Robinson JK. Actinic cheilitis: a prospective study comparing four treatment methods. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989;115(7):848-52.

Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, O-Charoent P, Eccles SA. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(1):47-69.

Saap JP, Eversole LR, Wysocki GP. Epithelial disorders. In: _____. Contemporary bucal and maxillofacial pathology. Santa Louis: Mosby; 1997. p.174-94.

Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Muller A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ. Damage to DNA by UV light and activation of transcription factors. *Biochem pharmacol.* 1994; 47(1):129-36.

Sainsbury JRC, Farndon JR, Needham GK, Malcolm AJ, Harris AL. Epidermal growth factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer. *Lancet.* 1987;1(8547):1398-1402.

Santini J, Formento JL, Francoual M, Milano G, Schneider M, Dassonville O, et al. Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 1991;13(2):132-39.

Safran H, Steinhoff M, Mangray S, Rathore R, King TC, Chai L et al. Overexpression of the HER-2/neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol.* 2001;24(5):496-99.

Saxby AJ, Nielsen A, Scarlett CJ, Clarkson A, Morey A, Gill A et al. Assesment of HER-2 status in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2005;29(9):1125-34.

Scheinberg RS. Carbon dioxide laser treatment of actinic cheilitis. *West J Med.* 1992;156(2):192-3.

Shankaran H, Wiley HS, Resat H. Modeling the effects of HER/ErbB1-3 coexpression on receptor dimerization and biological response. *Biophys J*. 2006;90(11):3993-4009.

Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res*. 1994;54(12):3153-59.

Slamon D, Clark G, Wong S, Levin W, Ulrich A, McGuire W. Human breast cancer : correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2 neu oncogene. *Science*; 1987;235(4785): 177-82.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt HA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244(4905):707-12.

Smith KJ, Germain M, Yeager J, Skelton H. Topical 5% imiquimoid for the therapy of actinic cheilitis. *J Am Acad Dermatol*. 2002;47(4):497-501.

Soto-Cruz I, Rangel-Corona R, Valle-Mendiola A, Moreno-Morales X, Santiago-Pérez R, Weiss-Steider B et al. The tyrphostin B42 inhibits cell proliferation and HER-2 autophosphorylation in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Invest*. 2008;26(2):136-40.

Spector NL, Xia W, Burris III H, Hurwitz H, Dees EC, Dowlati A et al. Study of the biologic effects of lapatinib, a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol*. 2005;23(11):2502-12.

Stanley RJ, Roenigk RK. Actinic cheilitis: treatment with the carbon dioxide laser. *Mayo Clin Proc*. 1988;63(3):230-5.

Stern DF. ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res*. 2003;284(1):89-98.

Taniyama K, Ishida K, Toda T, Motoshita J, Kuraoka K, Saito A et al. Tyrosine 1248-phosphorylated HER-2 expression and HER-2 gene amplification in female invasive ductal carcinomas. *Breast cancer*. 2008;15(3):231-40.

te Velde EA, Franke AC, van Hillegersberg R, Elshof SM, Weger RW, Rinkes IHMB, van Diest. HER family gene amplification and expression in resected pancreatic cancer. *EJSO*. 2009;35(10):1098-1104.

Thor AD, Liu S, Edgerton S, Moore II D, Kasowitz KM, Benz CC et al. Activation (Tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): a study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(18):3230-39.

Ulrich C, ForscherT, Ulrich M, Stockfleth, Sterry W, TemeerC. Management of actinic cheilitis using diclofenac 3% gel: a report of six cases. *Br J Dermatol*. 2007;156 (suppl 3):43-46.

van der Waal I, Axéll T, Gupta PC, Hansen L, Holmstrup P, Melta FS, Shear M et al. Diagnostic and therapeutic problems of oral precancerous lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1986;15:790-98.
 Visscher JGAM, van der Waal I. Etiology of cancer of the lip. *Int J Bucal Maxillofac Surg.* 1998;27(3):199-203.

Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Kiyokawa N, Clayman G, et al. Strong correlation between c-erb-2 overexpression and overall survival of patients with bucal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997;3(1): 3-9.

Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, et al. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of bucal squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res.* 1999;5(12):4164-74.

Walton GM, Chen WS, Rosenfeld MG, Gill GN. Analysis of deletions of the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylation at tyrosine 992 and enhanced in vivo tyrosine phosphorylation of cell substrates. *J Biol Chem.* 1990;265(3):1750-54.

Wang HQ, Quant T, He T, Franke TF, Voorhees JJ, Fisher GJ. Epidermal growth factor receptor-dependent, NF- κ B-independent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway inhibits ultraviolet irradiation-induced caspases 3, 8, 9 in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45737-45.

Waterman H, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Lett.* 2001;490(3):142-52.

Welbourne JP. Premalignant and malignant epithelial tumors of mucosa and skin. In: Marx RE, Stern DS. Bucal and maxillofac pathology: a rationale for diagnosis and treatment. Carol Stream; Quintessence Publishing C.O; 2003. p.330-55.

Wilkman TSE, Hietanen JPH, Malmstrom MJ, Konttinen YT. Immunohistochemical analysis of the oncoprotein c-erbB-2 expression in bucal benign and malignant lesions. Int J Bucal Maxillofac Surg. 1998;27(3):209-12.

Wiseman SM, Makretsov N, Nielsen TO, Gilks B, Yorida E, Cheang M et al. Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival. Cancer. 2005;103(9):1770-7.

Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, Kameda T, Ochiai A, Ito H et al. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. Cancer Res.1988;48(1):137-41.

Yeon CH, Pegram MD. Anti-erbB2 antibody trastuzumab in the treatment of HER-2 amplified breast cancer. Invest New Drugs. 2005;23(5):391-409.

Zimmermann M, Zouhair A, Azria D, Ozsahin M. The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. Radiation Oncol. 2006;1:1-6.

APÊNDICE A -Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Caro(a) senhor(a)

Eu, Márcia Hatakeyama, aluna da pós-graduação, portadora do CPF ____, RG ____, CRO/SP ____, juntamente com sua orientadora, Prof^a. Adj. Ana Sueli R. Cavalcante, estabelecida na Avenida Eng. Francisco José Longo, 777 – CEP: 12245-000, na cidade de São José dos Campos, cujo telefone de contato é (12)3947-9079, iremos desenvolver uma pesquisa cujo título é ‘‘ EXPRESSÃO DE HER-1 E HER-2 EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM LÁBIO INFERIOR’’.

O objetivo deste estudo é analisar o dano causado pela radiação ultravioleta no lábio inferior dos indivíduos portadores de queilite actínica (uma doença pré-maligna) e carcinoma de células escamosas (uma doença maligna) através de exame microscópio. Para isso, será utilizado o material da biópsia (remoção de um pequeno fragmento do lábio sob anestesia local) realizada para confirmar o diagnóstico da

doença. Necessito assim que o Sr.(a) permita a utilização do material de documentação (ficha clínica, biópsia e fotografia) para fazerem parte da pesquisa.

Informamos ainda que o Sr.(a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e sobre o andamento do trabalho, do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia da UNESP - CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS.

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contacto com o Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, situada na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, fone 012-3947-9076, e-mail suely@fosjc.unesp.br e comunique-se com a Coordenadora Profa.Dra. SUELY CARVALHO MUTTI NARESSI. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela Colaboração. Nos comprometemos a utilizar os dados coletados somente para a

pesquisa e os resultados serão veiculados por meio de artigos científicos em revistas especializadas e/ou encontros científicos e congressos, sem sua identificação.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Acredito ter sido esclarecido(a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em participar sabendo quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa. Concordo em participar voluntariamente deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

NOME/RESPONSÁVEL _____

RG _____ CPF _____

Endereço completo: _____

Assinat.Resp _____

Assinat.Pesquisador _____

Data ____/____/____

APÊNDICE B

Tabela 2- Distribuição relativa (%) dos níveis de expressão de HER-1, pHER-1, HER-2 e pHER-2 nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares (continua)

(continua)

HER-1		Grupos			Total (n=114)
Membrana		Controle (n=14)	QA (n=50)	CE (n=50)	
Escore	0	0	6	12	8
	1	7	22	10	15
	2	50	50	34	43
	3	43	22	44	34
Citoplasma					
Escore	0	0	10	14	11
	1	14	36	24	28
	2	64,5	54	34	46
	3	21,5	0	28	15
Núcleo					
Escore	0	100	100	98	99
	2	0	0	2	1
Total		100	100	100	100
pHER-1					
Membrana					
Escore	0	71,5	78	64	71
	1	21,5	18	26	22
	2	7	4	10	7
Citoplasma					
Escore	0	64	100	94	93
	1	29	0	2	4
	2	7	0	4	3
Núcleo					
Escore	0	36	62	54	55
	1	21	30	22	25,5
	2	29	8	18	15
	3	14	0	6	4,5
Total		100	100	100	100

Tabela 2- Distribuição relativa (%) dos níveis de expressão de HER-1, pHER-1, HER-2 e pHER-2 nos grupos Controle, QA e CE de acordo com as estruturas celulares (conclusão)

HER-2		Grupos			Total (n=114)
Membrana		Controle (n=14)	QA (n=50)	CE (n=50)	
Escore	0	57	76	70	71
	1	0	4	4	4
	2	14	10	14	12
	3	29	10	12	13
Citoplasma					
Escore	0	0	0	4	2
	1	0	8	8	7
	2	21	32	38	33
	3	79	60	50	58
Núcleo					
Escore	0	71	100	98	96
	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	29	0	2	4
Total		100	100	100	100
pHER-2					
Membrana					
Escore	0	71,5	96	60	77
	1	7	4	6	5
	2	21,5	0	22	12
	3	0	0	12	5
Citoplasma					
Escore	0	71,5	2	2	11
	1	7	28	16	20
	2	14,5	50	54	47
	3	7	20	28	22
Total		100	100	100	100

APÊNDICE C

Tabela 6 – Valores de mediana, Q1 e Q3 de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados de acordo com a estrutura celular nos grupos Controle, QA e CE

		Q1			Mediana			Q3		
		Controle	QA	CE	Controle	QA	CE	Controle	QA	CE
HER-1	Membrana	2,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	2,0	3,0
	Citoplasma	2,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2, 25	2,0	3,0
	Núcleo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
pHER-1	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0
	Citoplasma	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0
	Núcleo	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	2,0	1,0	1, 25
HER-2	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0, 25	2,0
	Citoplasma	2, 75	2,0	2,0	3,0	3,0	2,5	3,0	3,0	3,0
	Núcleo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0
pHER-2	Membrana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1, 25	0,0	2,0
	Citoplasma	0,0	1,0	2,0	0,0	2,0	2,0	1, 25	2,0	3,0

Apêndice D

Tabela 7 - Resultado do teste de Kruskal-Wallis (p-valor) em relação aos níveis de expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados de acordo com a localização na membrana, citoplasma e núcleo entre os grupos Controle, QA e CE

	Membrana	Citoplasma	Núcleo
HER-1	0,092	0,020	1
pHER-1	0,276	<0,001	0,045
HER-2	0,274	0,113	0,001
pHER-2	<0,001	<0,001	

Tabela 8 - Resultado do teste de Mann-Whitney (p-valor) em relação aos níveis de expressão de HER-1 e HER-2 totais e fosforilados de acordo com a localização na membrana, citoplasma e núcleo entre pares de grupos

		Membrana			Citoplasma			Núcleo		
		Controle	QA	CE	Controle	QA	CE	Controle	QA	CE
HER-1	QA				0,004					
	CE				0,378	0,063				
pHER-1	QA				<0,001			0,013		
	CE				0,010	0,242		0,171	0,176	
HER-2	QA							0,002		
	CE							0,007	1	
pHER-2	QA	0,005			<0,001					
	CE	0,327	<0,001		<0,001	0,176				

APÊNDICE E

Tabela 9 – Resultado da correlação de Spearman (p-valor) entre HER-1 e HER-2 totais e fosforilados nos grupos Controle, QA e CE

Grupos											
Controle				QA				CE			
Membrana											
HER-2	Coef. de correlação	HER-1	HER-2	pHER-1	HER-1	HER-2	pHER-1	HER-1	HER-2	pHER-1	pHER-1
	Valor de p	0,285			0,038			0,345[*]			
pHER-1	Coef. de correlação	0,324			0,796			0,014			
	Valor de p	-0,333	0,125		0,112	-0,172		0,431^{**}	0,318[*]		
pHER-2	Coef. de correlação	0,244	0,671		0,440	0,232		0,002	0,025		
	Valor de p	0,170	-0,150	-0,051	-0,306[*]	-0,113	0,128	0,090	0,231	0,236	0,098
Citoplasma											
HER-2	Coef. de correlação	0,355			0,397^{**}			0,321[*]			
	Valor de p	0,213			0,004			0,023			
pHER-1	Coef. de correlação	-0,325	0,383		-	-		-0,044	-0,039		
	Valor de p	0,257	0,176		-	-		0,760	0,788		
pHER-2	Coef. de correlação	-0,340	-0,054	,201	0,036	-0,176	-	0,271	-0,014	0,214	
	Valor de p	0,234	0,854	,492	0,805	0,221	-	0,057	0,922	0,136	
Núcleo											
HER-2	Coef. de correlação	-			-			-0,020			
	Valor de p	-			-			0,888			
pHER-1	Coef. de correlação	-	0,735^{**}		-	-		0,082	0,256		
	Valor de p	-	0,003		-	-		0,573	0,073		

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Al. São Diniz
CEP: 12201-970 - F. (12) 3947-9028
Fax: (12) 3947-9010 / suely@focj.usoc.br



CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **06/2007-PH/CEP**, sobre
“Expressão de Her-1 e Her-2 em queilite actínica e carcinoma de
células escamosas de lábio inferior”, sob a responsabilidade de
MÁRCIA HATAKEYAMA, está de acordo com os Princípios Éticos,
seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo
seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de
Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 13 de fevereiro de 2007



Prof. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

ANEXO B – Parecer de alteração do Título da pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – São Carlos – CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9000 – FAX (12) 3947-9028 –



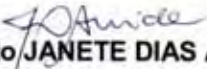
**Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos**

São José dos Campos, 28 de setembro de 2009

Ofício nº 066/09-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	MÁRCIA HATAKEYAMA
Projeto	EXPRESSÃO DE HER-1 E HER-2 EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR
PARECER	
Por solicitação da Pesquisadora, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, passando a denominar-se "EXPRESSÃO DE HER-1 E HER-2 TOTAIS E FOSFORILADOS EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO INFERIOR". Convalidando dessa forma o Protocolo nº 06/2007-PH/CEP de 13/02/2007.	

Atenciosamente,


Profa. Adjunto **JANETE DIAS ALMEIDA**
Coordenadora

Hatakeyama M. Expression of total and phosphorylated HER-1, HER-2 in actinic cheilitis and epidermoid carcinoma of lower lip [thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2010.

ABSTRACT

Actinic cheilitis (AC) is a multifocal lesion that occurs in lip vermillion with potential of malignant transformation to epidermoid carcinoma (EC). Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a member of tyrosine kinase family, involved in transformation and progression of malignant tumour. The aim of this study was to analyse the expression of total and phosphorylated HER-1 and HER-2 and correlate expression of these proteins with lesions of AC and CE in lower lip by immunohistochemistry. It was a study of 50 cases of AC, 50 of EC and 14 of Control. Proteins expressions were based on a score. Obtained datas were analysed by Kruskal-Wallis test and post-hoc analysis with Mann-Whitney test with Bonferroni correction and, Spearman correlation. The level of significance was 5%. The analysis of the comparison was statistically significant in membrane of pHER-2, group Control x AC and AC x EC; in cytoplasm of HER-1, Control x AC, pHER-1, Control x AC and Control x EC, pHER-2, Control x AC and Control x EC; in nucleus of pHER-1, Control x AC, HER-2, Control x AC and Control x EC ($p < 0,05$). The study of the correlation was statistically significant in membrane of HER-1 x pHER-2 expression in AC, HER-1 x HER-2, HER-1 x pHER-1 and HER-2 x pHER-1 in EC; in cytoplasm, HER-1 x HER-2 in AC, HER-1 x HER-2 in EC; in nucleus, HER-2 x pHER-1 in Control ($p < 0,05$). Our findings suggested that a higher expression in Control group could be due to a composition of this group by a variety of benign lesions that could present increased proliferation. Nuclear localization could be related not only with the action of intracellular cascade beginners, but also to action as transcription factors. Phosphorylation of HER-1 and HER-2 by MAPK pathway can be independent of total level of proteins in AC and EC lip lesions, because phosphorylation might be increased indirectly by UV radiation in a ligand independent way.

Key-words: HER. Immunohistochemistry. Cheilitis. Carcinoma. Lip.