



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

A influência do EGFR (Receptor do factor de crescimento epitelial) na carcinogénese oral e desenvolvimento das terapias alvo deste receptor.

Orientador: Doutor Fernando Alberto D. R. Alves Guerra
Co-orientador: Dr. Francisco J. Dias Marques

Ana Rita Martins Tavares Pereira
Coimbra 2012

A influência do EGFR (Receptor do factor de crescimento epitelial) na carcinogénese oral e desenvolvimento das terapias alvo deste receptor.

Pereira A.^{*}, Marques F.^{**} Guerra F.^{***};

* Aluna do 5.º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

** Assistente convidado, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra – Área de Medicina Dentária

*** Professor auxiliar, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra – Área de Medicina Dentária

Endereço: Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Avenida Bissaya Barreto, Bloco de Celas

3000-075 Coimbra

Telf: +351 239484183

Fax: +351 239402910

Coimbra, Portugal

Endereço electrónico: arntp@gmail.com

Sumário

1. Resumo.....	3
2. Lista de Abreviaturas.....	5
3. Introdução	6
4. Incidência e Prevalência	9
5. Factores de Risco	10
5.1 Tabaco	11
5.2 Álcool	12
5.3 Vírus do Papiloma Humano (HPV)	14
6. Tratamento.....	16
7. Ciclo Celular.....	18
8. Carcinogênese Oral	20
9. Marcadores Moleculares e a sua Influência no Ciclo Celular.....	22
10. Gene TP53.....	24
11. Ciclina D1.....	25
12. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)	26
13. Terapia Alvo	30
14. Conclusões e Perspectivas Futuras	36
15. Agradecimentos	39
16. Bibliografia	40

1 – Resumo

Introdução: Em média 5% dos tumores que ocorrem na cabeça e no pescoço localizam-se na cavidade oral. Apesar de existir uma favorável tendência na redução do consumo de tabaco, este juntamente com o consumo de álcool desempenham um papel determinante no desenvolvimento do cancro oral. Os recentes avanços na genómica, proteómica e na biologia molecular permitiram identificar a anormal sinalização que ocorre no cancro. Uma maior ênfase tem sido dada à imunoterapia, e à identificação de alvos terapêuticos assim como novos fármacos que actuem nas diversas vias de sinalização alteradas. O EGFR tem a sua expressão aumentada no CECCP e está relacionado com mau prognóstico. Assim, as pesquisas têm sido direccionadas na tentativa de sinalizar a actividade anormal do EGFR (sinalização celular). A terapia molecular alvo, nomeadamente anti-EGFR tem sido integrada com sucesso no tratamento do CECCP localmente avançado. O objectivo deste trabalho é compreender a influência que o EGFR desempenha na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias moleculares alvo que visam a sua inibição.

Materiais e Métodos: Foi realizada uma pesquisa nas bases de dados primárias MEDLINE (Pubmed), EBSCO library (EBSCOhost) e a B-on, utilizando a combinação de 2 das seguintes palavras-chave com o conector booleano “AND”: *Cell-Cycle; Epidermal Growth Factor Receptor targeting; Head and Neck Cancer; Monoclonal antibody; Oral Carcinogenesis; Targeted therapy; Tyrosine Kinase inhibitor; Signaling Pathways*. Desta pesquisa foram analisados 52 artigos com os idiomas limitados ao Inglês e Português e com um limite temporal de 1989 até 2012. Foram ainda consultados três livros de texto, um dos quais pertencente à Biblioteca da Área de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. As obras referidas na bibliografia foram essencialmente utilizadas na realização do desenvolvimento deste trabalho.

Conclusão: O Médico Dentista desempenha um papel fundamental no diagnóstico precoce do CECCP com a realização do exame oportunista no início de cada consulta. É fundamental reduzir os factores de risco e incentivar a cessação tabágica.

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

O progresso no tratamento do CECCP é evidente estando relacionado com o desenvolvimento da terapia alvo, nomeadamente fármacos que inibem o EGFR. A terapia alvo ainda não é eficaz nos estádios precoces da doença e a sua utilidade com terapia adjuvante tem que ser ainda estudada. Contudo, a utilização do cetuximab trouxe um aumento na sobrevivência e no controlo locoregional quando adicionado à radioterapia em pacientes com CECCP localmente avançado, recorrência e metástase. A actividade dos fármacos inibidores da tirosina cinase é promissora mas necessita ainda de mais ensaios clínicos. Tendo em consideração os resultados dos ensaios clínicos, estes sugerem que a inibição de apenas uma via de sinalização do EGFR não é suficiente, devido às inúmeras mutações e diferentes níveis de estimulação destas vias alteradas. É fundamental melhorar o conhecimento da biologia tumoral, projectar ensaios clínicos mais adequados e otimizar a aplicação destes novos fármacos, assim como a aplicação conjunta da terapêutica convencional com a terapia alvo.

2 - Lista de Abreviaturas

EGFR – Receptor do factor de crescimento epitelial

CECCP – Carcinoma espinho celular da cabeça e do pescoço

CDC – Activação dependente da citotoxicidade do complemento

ADCC – Citotoxicidade dependente de células mediadas por anticorpos

Nk - Natural Killer

MPKA – Proteína cinase activada pelo mitógeno

AKT – Proteína Cinase

HPV – Vírus papiloma humano

EBV – Epstein Barr

IMRT - Intensity modulated radiation therapy

DNA - Ácido desoxirribonucleico

CDKS – Ciclinas dependentes de cinases

EGF – Factor crescimento epitelial

TGF- α – Factor crescimento transformante alfa

Pi-3K – Fosfatidilinositol 3-cinase

PLCY – Fosfolipase C-y

STAT – Proteínas transdutoras e activadoras da transcrição

GRB2 – Receptor do factor de crescimento ligado à proteína 2

ERK1/2 – Cinases reguladas por sinal extracelular

FDA – Food and Drug Administration

ATP – Adenosina trifosfato

3 - Introdução

O cancro é uma doença preocupante e um grande problema de saúde pública, se não o maior problema do mundo no século XXI. Vários factores de risco para o desenvolvimento do cancro oral são bem conhecidos e amplamente estudados, nomeadamente o consumo de tabaco, o consumo de bebidas alcoólicas e predisposição genética.⁽¹⁾

O conceito da utilização da imunoterapia no tratamento do cancro já existe há mais de cem anos. Este conceito pressupõe conhecimentos obtidos de diversas disciplinas complementares e têm como objectivo a procura da *magic bullet*, como o fármaco que traga a cura no tratamento do cancro. Uma vez que o processo da carcinogénese se apresenta tão complexo, este objectivo parece inalcançável e longínquo.⁽²⁾

A carcinogénese ocorre de forma lenta, e caracteriza-se por ser um processo complexo e multifactorial pelo qual as células normais adquirem malignidade levando à formação de cancro. Distingue-se pela sequência de etapas a nível celular, molecular e de desregulação génica, levando à proliferação de células iniciadas, à sua promoção, aquisição de potencial invasivo e conseqüente metastização. Para além disto, vários genes têm sido implicados na progressão maligna, nomeadamente genes supressores tumorais, como o gene TP53 e Rb1, e também oncogenes como a família das ciclinas e o EGFR.⁽¹⁾

Com o desenvolvimento dos anticorpos quiméricos, humanizados e humanos houve um aumento na validade e utilização da imunoterapia no tratamento do cancro. Através da sinalização tumoral feita por anticorpos específicos ou associados, é possível eliminar selectivamente as células tumorais e manter um nível aceitável de toxicidade.⁽²⁾ Os anticorpos exercem a sua actividade tumoral através de quatro mecanismos distintos, perturbação da sinalização celular tumoral, activação dependente da

citotoxicidade do complemento, citotoxicidade dependente de células mediadas por anticorpos e indução da imunidade.

Relativamente ao primeiro mecanismo, os anticorpos podem ser concebidos para sinalizar mediadores como as citocinas para inibirem a capacidade de se ligarem a receptores e conseqüentemente activar a sua sinalização, ou podem ainda ter como alvo os receptores membranares, onde podem funcionar como agonistas ou antagonistas. O receptor do factor de crescimento epitelial (EGFR) e os anticorpos antagonistas inibem a sua capacidade de mediar a sinalização mitogénica. Na activação dependente da citotoxicidade do complemento (CDC), como parte do sistema imunitário inato, o sistema complemento é um dos primeiros mediadores da resposta imunitária aos patogénios e células comprometidas. A activação da cascata do sistema complemento pode ser parcialmente responsável pelos efeitos adversos associados à terapia com anticorpos. No que diz respeito à citotoxicidade dependente de células mediadas por anticorpos (ADCC), as células NK (Natural killer), são predominantes embora os macrófagos e granulócitos também pareçam mediar esta via numa menor extensão. Os macrófagos funcionam como efectores desta via, e normalmente estão associados a um prognóstico pobre embora isto não se verifique em todos os tipos de cancro. O último mecanismo pelo qual os anticorpos exercem função anti-tumoral é a indução de imunidade adaptativa. Mecanicamente, os anticorpos podem gerar imunidade adaptativa através da via CDC, ADCC e ainda fagocitose dependente dos anticorpos. ⁽²⁾

Vários grupos sugeriram que o máximo benefício da terapia com anticorpos ocorre quando esta via é activada, o que suporta esta hipótese é o facto de se verificarem benefícios clínicos tardiamente. ⁽²⁾

O EGFR é um membro da família dos factores de crescimento HER, importantes mediadores do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. ⁽³⁾ Este é expresso em diferentes tipos de cancro, nomeadamente o cancro do cólon, cabeça e pescoço, ovários, pulmões e gliomas malignos. A sinalização via EGFR leva à proliferação celular, migração e invasão, preferencialmente através da activação das vias MPAK e AKT, sendo este um mediador chave na transformação oncogénica e progressão tumoral. O cetuximab é o anticorpo monoclonal anti-EGFR mais amplamente estudado e induz a paragem do ciclo celular e apoptose das células tumorais através

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

do bloqueio da ligação do ligando. ⁽²⁾ A sua desregulação ou expressão aumentada está verificada em diferentes tipos de cancro, e em 90% dos casos de carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço (CECCP), relacionando-se com a agressividade clínica e o prognóstico dos mesmos. Este receptor foi o primeiro a ser identificado levando à aprovação da terapia alvo. Depois de estabelecida a importância deste receptor nos processos da carcinogénese, ocorre uma mudança significativa na terapêutica oncológica. ^(1,4)

O uso da imunoterapia faz-se em combinação com as terapêuticas convencionais. No que respeita à quimioterapia, trata-se de uma modalidade que induz a morte das células tumorais com um impacto insignificante na resposta imunitária anti-tumoral. Contudo, a morte celular induzida pelos agentes citotóxicos resulta na libertação de antígenos tumorais que podem levar à activação de efectores imunitários e ao desenvolvimento de imunidade adaptativa à sinalização tumoral. Apesar de existirem estudos que associam ambas as modalidades, ainda se encontram respostas controversas quando aplicadas a diferentes tipos de cancro. No que concerne à radioterapia, a combinação com a imunoterapia tem alcançado respostas satisfatórias e melhorou a taxa de sobrevivência de 5 anos no CECCP. ⁽²⁾

A terapia com anticorpos monoclonais tem vindo a revolucionar o tratamento do cancro e continuará a fazê-lo durante as próximas décadas. O sucesso clínico da imunoterapia está dependente do conhecimento dos seus efeitos na biologia tumoral e da resposta imune anti-tumoral. A combinação racional de terapias alvo com outros fármacos anti-tumorais que sinalizam o microambiente tumoral oferece a melhor hipótese de maximização do benefício da terapia alvo molecular. ⁽²⁾

O objectivo deste trabalho é compreender a influência que o EGFR desempenha na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias moleculares alvo que visam a sua inibição.

4 - Incidência e Prevalência

De acordo com as “Cancer Statistics 2012” está estimado que nos Estados Unidos da América, no final de 2012, haverá um total de 1,638,910 novos casos, ocorrerão 577,190 mortes, e uma em cada quatro pessoas morrerá devida ao cancro. ⁽⁵⁾ Anualmente, no mesmo país, o cancro da cabeça e do pescoço é responsável por aproximadamente 12,000 mortes. ^(5,6,7)

Os tumores da cabeça e pescoço englobam aqueles localizados na cavidade oral, lábios, nasofaringe e representam cerca de 15% de todos os tumores se considerarmos os linfomas, sarcomas de Kaposi, melanomas, carcinomas das células basais, contudo, mais de 90% dos carcinomas que acometem esta área anatômica são carcinomas espinho-celulares. ^(1,2,3,8) Em 2009, o cancro da cabeça e do pescoço espinho-celular foi considerado o sexto tipo de cancro mais frequente, segundo a WHO (World Health Organization). ^(1,8,9) Mundialmente o carcinoma espinho-celular apresenta uma incidência anual de 780.000 novos casos. ^(1,2) O cancro oral representa 2 a 5% de todos os tipos de cancro, mas apesar da sua incidência ser mais baixa que a de outros tipos, apresenta uma alta taxa de morbidade e mortalidade. ⁽¹⁰⁾

Cerca de 40% dos carcinomas da cabeça e do pescoço situam-se na cavidade oral, nos lábios, tecidos moles e duros, língua, gengivas, pavimento bucal, palato, glândulas salivares e orofaringe. ^(1,2) Dois terços dos novos casos de cancro oral ocorrem em países em desenvolvimento, nomeadamente África, América Central e do Sul, China, Ásia. Contudo a incidência do cancro oral está sujeita a variações locais, reflectindo a influência ambiental, particularmente o consumo de tabaco e álcool, dois dos factores de risco que mais contribuem para o aparecimento de cancro oral, como já referido. ^(2,9)

Na Índia e na Ásia, o cancro oral e da orofaringe correspondem a metade dos tumores malignos, esta alta prevalência corresponde à influência dos

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

carcinogéneos e factores epidemiológicos locais, como o tabaco de mascar. ^(1,11) A alta taxa de carcinoma espinho celular na Austrália deve-se à radiação solar e à sua íntima relação com o cancro do lábio, apresentando este país uma das mais altas taxas de incidência do mundo. ⁽⁹⁾

5 - Factores de Risco

Os factores de risco do cancro podem ser encontrados no meio ambiente ou podem ser hereditários. Os factores de risco relacionados com o meio ambiente são os hábitos e estilo de vida, exposição ocupacional, o ambiente de consumo de alimentos, medicamentos e dieta alimentar. ⁽¹²⁾ O consumo de tabaco e álcool tem um papel determinante no desenvolvimento do cancro oral nos países do Ocidente. ⁽¹⁾ Ainda que estes factores de risco sejam considerados de forma independente, quando associados o risco é multiplicativo, indicando um efeito sinérgico. ^(11,13)

No passado, o cancro oral, mais especificamente o carcinoma espinho-celular estava associado ao género masculino, nomeadamente homens com idade superior a sessenta anos, consumidores frequentes de tabaco e álcool. Demograficamente observa-se um aumento na incidência de carcinoma espinho-celular em pacientes com idade inferior a quarenta anos, mulheres com ou sem factores de risco associados. ⁽¹¹⁾ Curiosamente, cerca de 15% dos pacientes com cancro oral não apresentam factores de risco associados, e nestes casos a doença apresenta um curso bastante agressivo. Isto pode ser devido à relação exercida por infecções envolvendo vírus, como o HPV e o Epstein Barr (EBV), fungos como a *Cândida albicans* e algumas bactérias. ⁽¹⁴⁾ Em zonas com alta prevalência de cancro oral, verificam-se casos em pacientes com idade inferior a trinta cinco anos devido ao abuso no consumo das várias formas de tabaco. ⁽¹³⁾

5.1 - Tabaco

Grande maioria das pessoas que desenvolve carcinoma espinho-celular é fumadora, apresentando um risco cinco a sete vezes superior de desenvolverem cancro oral relativamente aos não fumadores. ^(11, 15) Na cavidade oral e laringe o risco é 15 vezes superior quando o consumo de álcool e cigarro estão combinados. ⁽¹⁶⁾

Os pacientes que não deixaram de fumar após o diagnóstico daquele carcinoma apresentam um risco seis vezes superior de desenvolverem um segundo tumor primário no tracto aerodigestivo, do que aqueles que pararam de fumar. ⁽¹¹⁾

Mais de 300 agentes carcinogénicos estão identificados no tabaco e nos seus componentes solúveis que passam para a saliva. ⁽¹³⁾ Os agentes mais estudados são o benzopireno, um hidrocarboneto aromático e as nitrosaminas específicas do tabaco, que produzem adutores de DNA, nomeadamente O6 metilguanina, interferindo com a replicação do DNA. Existe então um dano nas células replicativas, e na resposta imunitária. ⁽¹³⁾

Os agentes carcinogénicos do tabaco actuam ao nível do gene supressor tumoral p53, este gene é responsável por transcrever uma proteína nuclear que é fundamental para a reparação do DNA, transcrição e replicação. ⁽¹⁵⁾ Taxas elevadas de mutações no gene p53 têm sido identificadas em pacientes fumadores. ^(15,17)

O tabaco e as formas relacionadas, como o charuto, cachimbo, tabaco de mascar, contêm mais de 300 agentes carcinogénicos e pró-carcinogénicos que induzem mutações específicas. ⁽⁹⁾ Existe uma relação entre a forma como o tabaco é consumido e a localização do carcinoma, sendo esta relação mais evidente para o tabaco não fumado. Assim, o cancro do lábio está relacionado com os cachimbos e os charutos, devido também às altas temperaturas atingidas. ⁽¹³⁾

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

As localizações orais mais relacionadas com a acção do tabaco, são o pavimento bucal, a zona ventral e lateral da língua e a zona retro-molar. ⁽¹³⁾

O hábito de fumar invertido predispõe a lesões no palato, “stomatitis nicotina palatis”, principalmente no palato duro, produzindo hiperqueratose sem displasia epitelial significativa, verificando-se inflamação a nível dos canais excretores das glândulas salivares menores aí localizadas. Contudo o palato mole e duro são localizações menos frequentes. ⁽¹³⁾ O tabaco é um dos factores de risco passível de ser modificado, de modo a prevenir o aparecimento de cancro oral.

5.2 - Álcool

Determinar a influência do consumo de álcool no desenvolvimento de cancro oral é muito difícil. Vários estudos demonstram uma relação directa, sabendo que todos os comportamentos alcoólicos estão relacionados com um aumento do risco para o desenvolvimento de cancro oral. ^(9, 15)

Pacientes que consomem mais de cem gramas de álcool por dia, apresentam um risco trinta vezes superior de desenvolver carcinoma espinho-celular do que aqueles que consomem menos de quinze gramas por dia. ⁽¹¹⁾

O álcool desempenha um papel independente do tabaco na carcinogénese oral, como demonstram as altas taxas de mortalidade associadas ao cancro oral, em certas populações que têm um consumo elevado de álcool, mas não de tabaco. ⁽⁹⁾

Em pacientes que nunca foram fumadores, o consumo de álcool (mais de 3 bebidas por dia) tem sido associado a um aumento no risco de desenvolvimento de CECCP. ^(18,19)

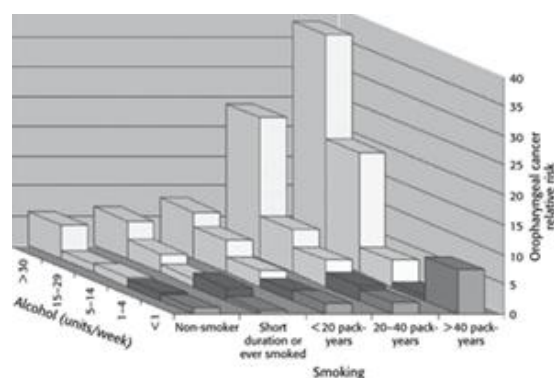


Figura 1 – Relação entre o risco de desenvolvimento de cancro orofaríngeo e o consumo de tabaco e álcool. Figura adaptada do artigo (Hermans R, editor. Squamous Cell Cancer of the Neck; Contemporary Issues in Cancer Imaging – Cambridge University Press 2008)

A literatura retrata mecanismos pelos quais uma lesão celular pode levar ao aparecimento de carcinoma devido ao consumo de álcool.

O metabolismo do etanol e a sua degradação até acetaldeído, substância altamente tóxica, aumenta a permeabilidade das membranas celulares aos efeitos directos das nitrosaminas carcinogénicas e à disrupção dos mecanismos de reparação do DNA. ^(11,15)

O álcool pode ter efeitos locais, acções directas nas membranas celulares, alterações na permeabilidade das mucosas pela dissolução dos lípidos extracelulares da mucosa oral e também efeitos sistémicos como deficiências nutricionais, imunológicas e função alterada do fígado. ⁽⁹⁾

A alteração da função hepática em alcoólicos crónicos pode levar a um decréscimo na desintoxicação de substâncias capazes de induzir lesão celular e supressão do funcionamento das células T. ⁽¹⁵⁾ Uma vez que o álcool é rico em calorias, existe uma supressão no apetite levando a uma dieta inadequada, que juntamente com o alcoolismo, origina deficiências nutricionais graves e doença hepática. ⁽¹³⁾

O uso regular de colutórios que possuem na sua constituição mais de 25% de álcool está relacionado com o desenvolvimento de cancro oral e constitui

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

um risco de 40% nos homens e 60% nas mulheres, dependendo também da sua frequência e duração. ⁽¹³⁾

Contudo, 10% a 20% dos pacientes com cancro oral, não consomem tabaco nem álcool, sugerindo a influência de outros factores na carcinogénese oral. ⁽²¹⁾

Uma pobre higiene oral pode ainda actuar sinergicamente com o álcool que nessas condições, aumenta a produção de acetaldeído na saliva, um metabolito do etanol que contribui também para o desenvolvimento do cancro. ⁽²²⁾

5.3 - Vírus do Papiloma Humano (HPV)

Cerca de 15% de todos os cancros humanos têm uma relação etiológica com vírus. ⁽¹³⁾ Existem perto de 100 genótipos de HPV que podem ser classificados como alto ou baixo risco, de acordo com o seu potencial oncogénico. ⁽¹⁾ Destes, apenas os genótipos HPV-16 e HPV-18 parecem ter relação com a carcinogénese oral, e o papel do genótipo HPV-16 no desenvolvimento do carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço poderá ser independente de outros agentes carcinogénicos. ^(2,9,19,23)

Cerca de 25% dos carcinomas espinho-celulares da cabeça e do pescoço contém HPV no DNA genómico. ⁽¹⁹⁾ A sua relação com o cancro do colo do útero está bem estabelecida, contudo para o cancro oral apenas é sugerida uma fraca associação devido às alterações citoplasmáticas nas lesões intra-orais serem semelhantes às lesões induzidas pelo HPV no cancro do colo do útero. ⁽²¹⁾

Vários estudos documentam um aumento na incidência de cancros relacionados com o HPV e estima-se que 60% a 70% de novos casos de cancro da orofaringe estão relacionados com o HPV nos Estados Unidos da

América e na União Europeia. ⁽²⁴⁾ O carcinoma espinho-celular relacionado com o HPV ocorre mais frequentemente em pacientes que não são fumadores, consumidores de álcool e imunossuprimidos. ⁽¹⁹⁾

Vários estudos demonstram que em cancros indiferenciados o DNA do HPV está intimamente relacionado com a invasão para os gânglios linfáticos e com um estadio tardio da doença, indicando um prognóstico reservado. ⁽²³⁾ Contraditoriamente, análises prospectivas e retrospectivas de ensaios clínicos indicam que pacientes com tumores positivos para o HPV têm a resposta favorável ao tratamento, um aumento da sobrevida e melhor resposta à quimioterapia e radioterapia quando comparados com tumores negativos para o HPV. ^(23,24) O mecanismo pelo qual o HPV contribui para a carcinogénese é através da produção de proteínas virusais E6 e E7 que formam complexos específicos com reguladores vitais do ciclo celular. ^(1,15) O complexo E6 interage com o gene p53, induzindo a sua degradação, e o E7 interage com um gene supressor tumoral, pRb, bloqueando a sua actividade. ^(1,15) Esta desregulação funcional destes genes supressores tumorais resulta na replicação incontrolada de DNA e a diminuição da apoptose o que explica o potencial tumoral. ⁽¹⁾ Segundo Julia E. Heck, entre outros, num estudo de 2010 que relaciona os comportamentos sexuais com o risco de desenvolvimento de cancro da cabeça e do pescoço, resultam associações, ainda que inconsistentes. O risco mais elevado foi encontrado em pacientes com maior número de parceiros sexuais. ⁽²⁵⁾

A associação entre o HPV e o carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço tem importantes implicações a nível preventivo, do tratamento e prognóstico, uma vez que a sua relação positiva é um factor de prognóstico favorável. ⁽¹⁹⁾

O vírus Epstein-Barr também desempenha um papel na etiologia do carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço. ⁽²⁶⁾ Em relação à nutrição, estudos epidemiológicos relatam que o consumo de frutas e vegetais ricos em vitamina A e C, e em betacaroteno está inversamente relacionado ao risco de cancro oral, enquanto a carne e a pimenta vermelha são considerados factores de risco. ⁽²⁶⁾ Além disso, o risco de desenvolvimento de carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço aumenta em indivíduos com síndromes como Li-Fraumeni, anemia de

Influência do EGFR na carcinogênese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

Fanconi, ataxia telangiectasia, síndromes que os tornam mais susceptíveis ao desenvolvimento de carcinomas. ⁽¹⁹⁾

Deve considerar-se ainda a susceptibilidade genética, uma história familiar positiva aumenta 3 a 5 % a probabilidade empírica do desenvolvimento do cancro da cabeça e do pescoço. ⁽²²⁾

6 - Tratamento

O tratamento do cancro oral passa primariamente, pelo diagnóstico precoce e pela prevenção. Contudo, apesar da cavidade oral ser relativamente fácil de examinar, o diagnóstico é feito num estadio muito avançado da doença. ⁽¹¹⁾

O diagnóstico precoce do cancro oral, ou seja, quando ainda se encontra numa situação favorável ao tratamento é uma meta fundamental para o médico dentista, reduzindo as altas taxas de mortalidade e morbidade associadas.

Frequentemente, os carcinomas espinho-celulares são confundidos com úlceras benignas, lesões traumáticas, ou anomalias do tecido mole, e o diagnóstico de lesões assintomáticas é muitas vezes feito por exclusão. ⁽¹⁵⁾

O *gold standard* do tratamento do cancro oral é a ressecção cirúrgica. Os cancros da orofaringe, laringe e hipofaringe são tratados inicialmente com quimioterapia, para a preservação dos órgãos. Nestes, a técnica cirúrgica está reservada para os tumores primários pequenos e nos casos de recorrência. ⁽¹¹⁾

O estadiamento do cancro oral é determinante para escolher o tratamento adequado, sendo para isso utilizada a classificação TNM em que o T significa (extensão tumoral) o N (estado dos gânglios linfáticos) e o M (presença ou ausência de metástases à distância). ⁽²⁷⁾ Os estadios iniciais

do cancro oral (I e II) podem ser tratados com cirurgia e radioterapia de forma isolada, nos estadios mais avançados (III e IV) são geralmente tratados de forma combinada, cirurgia seguida de radioterapia. ⁽¹⁾ Usando diferentes protocolos que combinam radioterapia pré e pós operatória, e/ou quimioterapia de forma adjuvante a taxa de sobrevivência aos 2 e 5 anos para os casos avançados é, respectivamente, 20% e 12%. ⁽¹⁾

De facto, os pacientes com estadios muito avançados raramente excedem os 30 meses de sobrevivência, mesmo quando atingiram remissão clínica. ⁽¹⁾

A radioterapia pode ser classificada como primária ou adjuvante, sendo a primária reservada para pacientes com tumores não operáveis. As complicações incluem mucosite e eventualmente osteonecrose devido às doses de radiação requeridas para alcançar um tratamento curativo, que se situam entre os 60 e 70 Gy. ⁽¹¹⁾ A utilização de radioterapia no pós-operatório está indicada na presença de alto grau de diferenciação histológica, margens invadidas, metástases nos gânglios linfáticos, estádios III e IV da doença. ⁽¹¹⁾ O principal avanço na radioterapia consistiu no desenvolvimento de tecnologia computadorizada que possibilita que a energia seja distribuída mais especificamente para o tumor, com mínima exposição para os tecidos envolventes. A combinação de vários campos de intensidade modulada, proveniente de diferentes direcções, produz um tratamento com radiação feito para se ajustar à anatomia específica de cada tumor. Este processo tem o nome de IMRT (“Intensity-Modulated Radiation Therapy”) e aumenta a protecção da radiosensibilidade aos tecidos sãos que circundam as lesões malignas. Assim, doses de radiação mais efectivas são distribuídas com menos efeitos adversos que as técnicas de radioterapia convencional. ⁽³⁾

Relativamente à quimioterapia, esta actua destruindo as células que se dividem rapidamente, uma das propriedades mais importantes das células cancerígenas. Contudo, também significa que lesa células normais, resultando em substanciais efeitos adversos. ⁽²⁸⁾ A quimioterapia é usada como um sensibilizador para a radioterapia em pacientes com recorrência loco-regional e metástases. Também é usada como tratamento neo-adjuvante pré-operatório juntamente com a radioterapia para melhorar a ressectabilidade de estadios muito avançados. ⁽¹⁵⁾ O papel da quimioterapia evoluiu desde o tratamento paliativo até estar estabelecida no protocolo terapêutico do carcinoma espinho-celular localmente avançado. São

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

utilizados várias classes de fármacos como os compostos de platinum, antimetabolitos e taxanos, sendo o cisplatin o agente de referência em combinação com a radiação ou outros agentes. ⁽¹⁹⁾

A cavidade oral é extremamente importante para as funções fisiológicas como falar, deglutir e mastigar. A técnica terapêutica cirúrgica pode comprometer a realização destas funções e consequentemente comprometer a qualidade de vida do paciente. Ainda assim, o objectivo da terapêutica ablativa cirúrgica deve ser a remoção total do tumor, com margem de segurança livre de tumor. ⁽¹¹⁾

Apesar da remoção local parecer adequada, as taxas de recorrência variam entre 25% a 48%, assim como ocorrência de segundos tumores primários em cerca de 4 a 7% por ano, como resultado do campo de cancerização. O campo de cancerização baseia-se na teoria da exposição repetida de um campo aos mesmos factores de risco, como os carcinogéneos presentes no álcool e no tabaco, levando ao desenvolvimento de lesões independentes. ^(15,26) Ainda que se verifiquem avanços nas técnicas cirúrgicas e na quimioterapia como terapia neo-adjuvante, o prognóstico para pacientes com carcinoma espinho-celular da cavidade oral continua mau. A grande melhoria passa pelo reconhecimento precoce dos sinais e sintomas, tanto pelos pacientes como os profissionais médicos, bem como os factores de risco associados ao cancro oral.

7 - Ciclo Celular

Recentemente assistiu-se a um aumento significativo no conhecimento e na compreensão de como a sinalização intercelular é feita na decisão das funções celulares, como diferenciação celular, sobrevivência, metabolismo, motilidade, crescimento normal e aberrante. A desregulação dos eventos moleculares que controlam o ciclo celular tem emergido como um tema principal na carcinogénese oral; assim na maioria dos mecanismos que

estão envolvidos na transformação de uma célula normal para uma célula potencialmente maligna interfere no ciclo celular. ^(12,17)

A actividade proliferativa de um tecido ou de uma neoplasia é medida determinando-se a fracção média do crescimento e o tempo médio do ciclo celular. Quanto mais alta for a actividade proliferativa de um tumor, é lícito esperar-se que maior seja o potencial de malignidade e pior o prognóstico. A simples contagem do número de mitoses fornece algumas evidências genéricas desta actividade. ⁽²⁷⁾

O ciclo celular divide-se tradicionalmente em interfase e mitose, a mitose ou fase M, é a fase da divisão, sendo a interfase, o período entre divisões. A replicação dos cromossomas ocorre durante a interfase, originando a sua divisão em três partes. Na fase G1 a célula executa as suas funções normais, dá-se o crescimento e preparação para a replicação dos cromossomas. De seguida surge a fase S, fase de síntese, síntese de DNA, replicação cromossómica e síntese de histonas. Por último a fase G2, caracterizada pela preparação para a divisão mitótica e pela síntese de proteínas. A célula cresce e executa as suas funções, verificando-se que, as células que pararam de se dividir quer temporária, quer definitivamente, fazem-no num ponto imediatamente anterior à iniciação da síntese de DNA.

De modo a executar as etapas do ciclo celular numa ordem correcta as células possuem controlos que monitorizam o estado dos acontecimentos ao longo do ciclo celular. Assim se o sistema detecta um erro, o ciclo celular pára até que a normalidade seja reposta. Se, no entanto, o sistema de vigilância falha na detecção de anomalias, o ciclo prosseguirá para a etapa seguinte, perpetuando o erro. ⁽²⁹⁾ Muitas das alterações moleculares que causam comportamento biológico anormal de células cancerígenas são baseadas em anomalias de regulação do ciclo celular como: resistência à apoptose, tolerância a DNA danificado, progressão de células com oncogenes activados e/ou, genes supressores tumorais inactivados, passando inúmeros *checkpoints* resultando num aumento da instabilidade genómica. ⁽⁵⁾

A regulação do ciclo celular é feita de forma extrínseca e intrínseca por inúmeros mecanismos. Na forma extrínseca, o ênfase recai no complexo ciclinas/ CDKs (ciclinas dependentes de cinases). Em todas as células

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

eucariotas a progressão do ciclo celular é controlada pela activação e inactivação sucessivas destes complexos. ⁽²⁹⁾ Os membros da família das ciclinas interagem com as CDKs, e estas, por sua vez, são requeridas para que o ciclo celular avance. ⁽¹⁷⁾

As ciclinas por vezes tomam a designação de mitóticas, ou de fase S, consoante o seu pico de expressão se manifesta na fase M ou S. Demonstrou-se, posteriormente, que os complexos ciclina-CDKs, responsáveis pelo controlo do início da fase S e da mitose são distintos, e que aumentando a actividade destas CDKs se conseguiam acelerar essas fases. ⁽²⁹⁾ Ao contrário das ciclinas, os níveis estacionários das CDKs não são modulados durante o ciclo celular. ⁽¹⁷⁾

O EGFR é um alvo com interesse crescente e desempenha um papel fundamental na regulação da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência das células epiteliais e dos tumores com origem celular epitelial. ⁽³⁰⁾

8 - Carcinogénese Oral

A carcinogénese é um termo usado para descrever o processo de formação neoplásica sendo um fenómeno multifactorial complexo, com vários passos e onde três etapas, ainda que discretas, se destacam: a iniciação, a promoção e a progressão. Resulta da acção de agentes carcinogénicos químicos, físicos e biológicos que causam danos genéticos às células. ⁽³¹⁾ Na carcinogénese ocorrem mudanças ao nível da estrutura genómica durante as três fases, mas mudanças na expressão génica também ocorrem durante a promoção, com proliferação selectiva das células iniciadas e o desenvolvimento de células pré-neoplásicas. Durante a iniciação e promoção, a proliferação celular e a apoptose ocorrem a diferentes níveis, mas sempre equilibradas. Na progressão, este balanço já não se verifica e é modificado, surgindo a malignidade. ⁽³²⁾

A fase da iniciação é constituída por uma série de eventos onde um agente cancerígeno exógeno ou endógeno induz alterações no genoma celular resultando numa lesão irreversível e que confere à célula o potencial de crescimento maligno. De uma perspectiva fenotípica as células iniciadas são células similares às normais. O dano ao DNA celular está estabelecido como o evento principal e desencadeante da carcinogénese. ⁽³²⁾ Nesta fase, as células iniciadas mantêm-se latentes durante semanas, meses e até anos, ou podem crescer de forma clonal, tornando estas células mais susceptíveis a novas agressões carcinogénicas. A expansão clonal das células iniciadas resulta de um processo mitogénico causado pelo aumento do número de novas células e inibição da apoptose, o que evita a morte das células iniciadas. ⁽³²⁾ A proliferação celular é essencial na iniciação e se a divisão celular ocorrer antes que a reparação do DNA, o dano torna-se permanente e irreversível. A evolução de uma célula iniciada não é independente das células vizinhas e a desorganização de um tecido é um factor de carcinogénese. A iniciação é um processo aditivo, o desenvolvimento neoplásico depende da dose do carcinogéneo e aumentando a dose aumenta também a incidência e a multiplicidade das neoplasias, reduzindo o tempo de latência da sua manifestação. ^(31,32) A iniciação também pode ser desencadeada por mutações espontâneas e erros na replicação do DNA, sugerindo uma indução espontânea da iniciação, ainda que mais raramente que a iniciação induzida. ⁽³³⁾ É importante referir que ocorrem 10^{-16} mutações por gene, por divisão celular, principalmente devido a erros ocorridos na replicação de DNA. Devido à existência de aproximadamente 10^{16} divisões celulares durante uma vida, uma pessoa poderá sofrer até 10^{10} mutações por gene. ⁽³⁴⁾

Relativamente à promoção, a principal característica que distingue a promoção da fase de iniciação e progressão é o facto de ser reversível. Após o desaparecimento da acção do agente promotor a regressão na proliferação pode ocorrer, provavelmente por apoptose ⁽³²⁾. Em contraste com a fase da iniciação, a promoção é continuamente modulada por uma variedade de factores ambientais, incluindo a frequência com que o agente promotor é administrado. ⁽³³⁾

Os agentes promotores não interagem directamente com o DNA nem desencadeiam efeitos biológicos sem estarem metabolicamente activados.

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

Estes agentes aumentam a proliferação celular nos tecidos susceptíveis, contribuem para a fixação das mutações, potenciam alterações na expressão genética e no controlo do crescimento celular. Por outro lado estes agentes promotores podem lesar indirectamente o DNA por oxidação.⁽³¹⁾ Os mesmos agentes promotores atrasam a inibição natural das células em quiescência ou em G0, pelo que a sua actividade mais importante é a mitogénese. O agente promotor deve estar presente durante semanas, meses e anos de maneira a ser eficaz e a sua eficácia depende da sua concentração no tecido alvo.⁽³²⁾

A progressão é caracterizada pela conversão de doenças potencialmente malignas, que se situam entre a iniciação e a promoção, em lesões malignas, sendo esta a última e mais extensa fase da carcinogénese. Nesta fase o fenótipo maligno é adquirido por mecanismos genéticos e epigenéticos.⁽³²⁾ É caracterizada por ser uma fase irreversível, com instabilidade genética, crescimento rápido, invasão, metastização, e mudanças bioquímicas, metabólicas e morfológicas nas células.⁽³⁵⁾

Na progressão, a proliferação celular é independente da presença de estímulo.⁽³²⁾ A angiogénese, como fenómeno epigenético, é essencial na progressão neoplásica. A aquisição de um fenótipo angiogénico precede o desenvolvimento das características que contribuem para a malignidade e a sua inibição atrasa o desenvolvimento maligno.⁽³³⁾ Em modo de conclusão, a fase da progressão é a fase em que o clínico deve tratar a doença e a fase da promoção é aquela em que existe maior potencial para prevenir desenvolvimento adicional do processo neoplásico.⁽³¹⁾

9 - Marcadores Moleculares e a sua Influência no Ciclo Celular

As células malignas crescem descontroladamente e com o passar do tempo escapam à senescência celular e à morte celular programada. As neoplasias podem ser classificadas em benignas ou malignas de acordo com as

características celulares que apresentam.⁽³²⁾ As células que constituem uma neoplasia maligna apresentam ainda mais alterações, que foram descritas por Weinberg em 2000. Assim as células malignas apresentam resistência à morte celular, capacidade de indução de angiogénese, capacidade de replicação ilimitada, invasão e metástase, escapam aos supressores de crescimento e conseguem a manutenção da sinalização proliferativa.⁽³⁶⁾ De seguida, aumentam a demanda de oxigénio e nutrientes para promover a formação de novos vasos sanguíneos e adquirem a habilidade de migrar da sua localização original, invadindo tecidos vizinhos e metastizando para outras localizações anatómicas.⁽⁸⁾

Estas progressivas alterações no comportamento celular, desde a desregulação proliferativa até à total malignidade são resultado da acumulação de mudanças genéticas e epigenéticas num conjunto limitado de genes.⁽⁸⁾

Entre eles, duas classes de genes, oncogenes e genes supressores tumorais desempenham um papel importante desencadeando e promovendo o crescimento cancerígeno. Os oncogenes activados promovem a proliferação celular, e os genes supressores tumorais inibem o crescimento celular e contribuem para o processo carcinogénico quando sofrem mutações genéticas ou epigenéticas.⁽⁸⁾

Os genes supressores tumorais codificam proteínas que transmitem sinais negativos reguladores do crescimento celular. Quando estes genes estão inactivados, as células escapam ao controlo do ciclo celular, levando à divisão celular descontrolada.

Vários estudos citogenéticos e moleculares também investigaram a ocorrência de alterações genéticas em tumores de cabeça e pescoço, demonstrando que a activação de oncogenes, tais como: *ciclina D1*, *H-ras*, *EGFR*; e inactivação de genes supressores de tumor, como: *P16*, *TP53*, *P21*; expressão de factores angiogénicos e metastáticos; além dos polimorfismos genéticos de enzimas metabólicas estão envolvidos no desenvolvimento da doença.⁽²⁶⁾

10 - Gene *TP53*

O gene *TP53* localiza-se no cromossoma 17p13 (tumor protein p53) e está envolvido em muitas funções celulares, actua na transcrição génica, na regulação do ciclo celular, na duplicação centrossómica, na reparação do DNA, na senescência, na apoptose, na diferenciação e no desenvolvimento celular.

Este gene encontra-se mutado em 50-60% dos casos de CECCP.⁽⁹⁾ A oncoproteína p53 funciona como guardião do genoma, actuando quando o DNA é danificado. Quando isto acontece, uma grande quantidade de proteína é produzida induzindo a paragem do ciclo celular na transição G1/S, dando tempo para que a reparação do DNA aconteça ou caso o dano seja irreparável inicia a morte celular por apoptose.^(16,26,27)

Por outro lado, mutações no p53, permitem a sobrevivência e reprodução de células contendo lesões no DNA. Desta forma, as células alteradas transmitem as mutações que contêm à sua descendência, que terá depois a oportunidade de acumular mutações adicionais necessárias para o desenvolvimento de neoplasias.⁽²⁹⁾

A detecção de mutações nas margens cirúrgicas ou nos nódulos linfáticos cervicais considerados histologicamente livres da doença, pode auxiliar na localização das células cancerígenas persistentes, no sangue ou na medula óssea, na ausência de doença clínica, radiológica e histopatológica. Isto colocaria o tumor noutra estadia evolutivo e determinaria outros protocolos terapêuticos.⁽¹⁶⁾

A expressão elevada da proteína p53 nos tumores primários é considerada um sinal preditivo de sobrevida reduzida em função de sua associação com a recorrência de tumores primários e secundários, e ainda com uma resposta desfavorável à quimioterapia e radioterapia.^(16,17)

Relativamente à terapia de tumores contendo mutações nestes genes, pensa-se, actualmente, que o restabelecimento funcional de um gene supressor tumoral, como o p53 ou o Rb, poderá ser suficiente para induzir a apoptose celular e parar o crescimento tumoral, tal como é sugerido pelo facto de a introdução de genes p53 e Rb normais em células tumorais ser capaz de inibir o seu crescimento. ⁽²⁹⁾ O restabelecimento da função de um gene está na origem da terapia génica.

11 - Ciclina D1

As ciclinas são extremamente importantes durante o ciclo celular e são divididas em quatro tipos: A, B, D e E. ⁽²⁶⁾

A ciclina D1 é um proto-oncogene que responde a estímulos extracelulares e apresenta um papel fundamental como controlador da progressão da fase G1 no ciclo celular. O complexo CDK4-6/Ciclina D1 estimula a progressão do ciclo celular pela fosforilação da proteína pRB, sendo libertados factores de transcrição que induzem mudanças metabólicas levando à replicação do DNA. ⁽²⁶⁾ Apesar de existir ainda alguma controvérsia relativamente à relação entre a ciclina D1 e o CECCP alguns estudos demonstram que a amplificação ou expressão elevada está associada a uma pobre resposta à quimioterapia e a uma redução da sobrevida. ⁽²²⁾

Por outro lado, a amplificação da ciclina D1 tem sido encontrada em 17-70% das amostras de CECCP. Embora o significado prognóstico da ciclina D1 permaneça discutível, dados demonstram uma correlação entre a sobreexpressão de ciclina D1 e prognóstico reservado. ⁽²⁶⁾

12 - EGFR (Epidermal growth factor receptor)

Após ter sido estabelecida a ligação entre um oncogene viral com o receptor do factor de crescimento epitelial, foi reconhecida a importância que a sinalização anormal dos factores de crescimento desempenha no desenvolvimento das neoplasias humanas. ⁽⁸⁾ Os factores de crescimento e os seus receptores de membrana desempenham papéis importantes na proliferação celular, sobrevivência, adesão, migração e diferenciação. ⁽¹⁶⁾

O gene EGFR (Receptor do factor de crescimento epitelial) localiza-se no cromossoma 7p13, é um receptor de tirosina cinase e um oncogene amplamente estudado no cancro da mama, pulmão e também no CECCP. ⁽⁶⁾ A família de receptores ErbB, família à qual pertence o EGFR (ErbB-1 ou Her-1) tem recebido especial atenção devido à capacidade que apresenta para estimular a proliferação epitelial. ⁽¹⁾

Este gene codifica um receptor transmembranar que se liga ao factor de crescimento epitelial (EGF), ao factor de crescimento transformante alfa (TGF – α) e ainda a outras proteínas reguladoras.

As interacções iniciais entre o ligando/receptor e receptor/receptor ocorrem primeiramente a nível da superfície celular. Os receptores ErbB são compostos por um domínio extracelular de ligação ao ligando, um segmento transmembranar e um domínio intracelular de proteína cinase com um segmento terminal regulador carboxil.

Sobre condições fisiológicas, uma variedade de ligandos da família do EGFR conduz a formação de homodímeros ou heterodímeros com os quatro receptores ErbB, o que proporciona amplificação e diversificação. Os receptores do factor de crescimento epitelial e os membros da família de receptores (HER2/3/4) ficam activados por dimerização. Os mecanismos que promovem a formação de dímeros de receptores incluem a ligação do ligando, a sobreexpressão do receptor e a transactivação (heterodimerização). Após a dimerização do receptor ocorre a activação da

actividade da proteína tirosina cinase intrínseca resultando na autofosforilação da tirosina, Ras intracelular e cascatas de proteínas cinases. Estes eventos resultam no recrutamento e fosforilação de vários substratos intracelulares, levando à sinalização mitogénica e outras actividades celulares. ⁽³⁷⁾

A actividade anormal desta família de receptores tem sido relacionada com o desenvolvimento e crescimento de diversos tumores, incluindo 80-90% dos casos de CECCP. ⁽²⁶⁾ Logo, a expressão elevada do EGFR poderá representar um marcador independente de prognóstico relacionado com o aumento do tamanho do tumor, aumento da probabilidade de recorrência e ainda decréscimo da sensibilidade à radiação. A actividade do EGFR poderá encontrar-se elevada como resultado do aumento da regulação, amplificação, mutação e/ou actividade aumentada dos seus ligandos ou co-factores. ⁽³⁸⁾

Curiosamente o consumo de tabaco aumenta os níveis dos ligandos do EGFR (anfiregulina, TGF- α) resultando numa activação do EGFR e também níveis elevados de Ciclo-oxigenase-2 e prostaglandina E-2, que podem transactivar o EGFR. ⁽³⁰⁾ De uma forma geral o mecanismo predominante pelo qual se verifica a expressão aumentada do EGFR é a amplificação génica, levando a activação da actividade da cinase pela sua dimerização espontânea. Esta activação do EGFR no CECCP é também causada por estimulação autócrina através da co-expressão do EGFR com um dos seus ligandos, TGF- α , frequentemente observado no CECCP estando relacionado com um pobre prognóstico. ⁽⁸⁾ Em adição, estudos recentes tem revelado a presença de EGFR fosforilado a nível do núcleo de vários tumores actuando como factor transcripcional de proteínas como a Ciclina D. ⁽³⁸⁾

Os efeitos da activação do EGFR após a dimerização, internalização e autofosforilação do receptor são mediados através da transdução de vias de sinalização envolvendo o RAS/MAP cinase, o fosfatidilinositol 3-cinase (PI-3K) /Akt, o PLC γ e por último JAK-STAT como demonstrado na figura seguinte. ⁽³⁰⁾

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

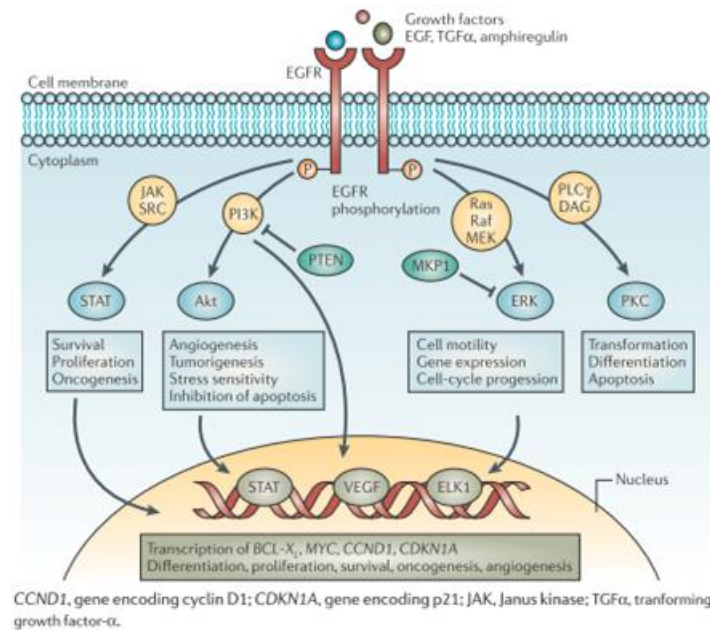


Figura 2 – Principais vias de sinalização reguladas pelo EGFR

Figura adaptada do artigo (Leemans CR, Boudewijn JM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. Nature Reviews Cancer January 2011 January; (11) 9-22.)

Esta figura demonstra as vias de transdução que podem ser reguladas pelo ligando EGFR quando ligadas ao receptor de tirosina cinase. Estas vias podem ser reguladas por vários mensageiros secundários: JAK, PI3K (fosfatidilinositol 3-cinase), RAS-MAPK (proteína cinase activada pelo mitógeno) e PLC γ (fosfolipase C γ). A activação destes segundos mensageiros é regulada por um processo de fosforilação em cadeia que pode directa ou indirectamente induzir a transdução do sinal. Assim activam-se a transcrição de proteínas citoplasmáticas STAT (proteínas transdutoras e activadoras da transcrição) que se deslocam para o núcleo, regulando directamente a expressão génica para a sobrevivência, proliferação da célula e também oncogénese. Na segunda via de activação o EGFR activa o fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) que, através de processos de fosforilação, atinge o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato e este activa proteínas cinases (Akt). A fosforilação destas proteínas provoca vários efeitos a nível citoplasmático e nuclear, incluindo a inibição do factor pró-apoptótico BAD (antagonista da Bcl-2, responsável pela morte celular), da enzima procaspase-9 e do rapamycin, que desempenham papéis fundamentais na angiogénese e na

estimulação da proliferação celular. O factor de crescimento vascular endotelial e a hipóxia são factores essenciais na angiogénese. ⁽³⁹⁾

A terceira via de sinalização ocorre através do RAS-MAPK (proteína cinase activada pelo mitogénio) e é activada após activação do EGFR por dois mecanismos diferentes. No primeiro é necessário o recrutamento directo de GRB2 (receptor do factor crescimento ligado à proteína 2), ou ainda o recrutamento de forma indirecta do mesmo. Após activação do RAS, este liga-se ao RAF despoletando a fosforilação da MEK1/2 e ERK1/2 (cinases reguladas por sinal extracelular). Estas são responsáveis por eventos como a motilidade celular, expressão génica e progressão do ciclo celular. Na última via de sinalização a PLC γ (Fosfolipase c- γ) fica activa pela ligação ao EGFR fosforilado, uma vez activada hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato até diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). O IP3 controla os níveis intracelulares da libertação de cálcio onde o DAG actua como um co-factor para a activação da serina/treonina cinase da proteína cinase C (PKC). A activação do PKC resulta numa progressão do ciclo celular, transformação, diferenciação celular e apoptose. ⁽³⁹⁾

Embora os principais locais de fosforilação nos receptores ErbB recrutem de forma extensiva moléculas que se sobrepõem aos receptores activos, ocorrendo modulação da sinalização dos diferentes caminhos o EGFR com mutação no domínio de tirosina cinase activa preferencialmente o caminho PI-3K/AKT e STAT. ⁽³⁰⁾ Independentemente do mecanismo é bastante evidente que existem diferenças significativas no fenótipo da activação do receptor dependendo da combinação dos dímeros envolvidos. ⁽⁴⁰⁾

13 - Terapia Alvo

O tratamento convencional do carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço envolve frequentemente a combinação de cirurgia e radioterapia, e/ou quimioterapia. Contudo o limite de eficácia destes tratamentos está frequentemente relacionado e limitado pela sua toxicidade. As terapias alvo devido à sua especificidade para os alvos moleculares tumorais oferecem a possibilidade de melhorar os resultados das terapias convencionais sem aumentar significativamente os limites tóxicos. ^(livro) O objectivo das pesquisas está a ser direccionado para o desenvolvimento de terapias com alvos moleculares ou marcadores moleculares que são úteis na predição dos tratamentos ou na selecção dos pacientes para terapias moleculares específicas baseadas nas características do tumor. ⁽³⁴⁾

Uma vez que a terapia alvo molecular anti-EGFR está sobre constante investigação e desenvolvimento no CECCP é necessário um conhecimento exaustivo sobre as alterações deste para conceber os protocolos terapêuticos mais apropriados. ⁽⁴⁰⁾ Dada a evidência substancial do envolvimento da família de membros da ErbB na oncogénese não é surpreendente que esta família de receptores tenha sido área de crescente actividade no desenvolvimento de novos fármacos. ⁽³²⁾ O EGFR e HER-2 são conhecidos dentro desta família de receptores por desempenharem importantes papéis na carcinogénese de diversos tipos de tumores. Uma vez activado, o EGFR activa importantes vias de sinalização comuns como a Ras/Raf/Mek/Erk e PI3K/AKT. A activação da MAPK estimula a divisão e a proliferação celular, a via PIK3/AKT está relacionada com a sobrevivência celular. ⁽⁴²⁾ O objectivo das terapias alvo é promover a inibição do EGFR e consequentes vias de sinalização.

O espaço de tempo desde a identificação do factor de crescimento epitelial em 1965, desde a confirmação da inibição da sinalização do EGFR como uma estratégia terapêutica anti-tumoral em 1983, até à aprovação de um agente anti-EGFR em 2003 demonstra o desafio que representa o

desenvolvimento de novos agentes promissores na terapêutica anti-tumoral. ⁽⁴³⁾ Um grande avanço na terapêutica do carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço ocorreu com a introdução de terapias alvo nos protocolos terapêuticos, na tentativa de superar a resistência que ocorre com o fracasso da terapia inicial. ⁽⁴⁴⁾

Presentemente o alvo mais importante para o desenvolvimento de novas estratégias é o receptor do factor de crescimento epitelial (EGFR). O EGFR foi identificado por Stanley Cohen aproximadamente há 50 anos atrás e aprovado para terapia há relativamente pouco tempo - 6 anos. ⁽³⁷⁾ A activação do EGFR é um dos mecanismos pelo qual se desenvolve resistência à terapia convencional com radioterapia e ou quimioterapia, tornando-se este um plausível reforço terapêutico. ⁽⁴⁵⁾ A identificação das alterações moleculares que ocorrem durante a carcinogénese permitiu o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Vários agentes anti-EGFR, incluindo anticorpos monoclonais, inibidores específicos da tirosina-cinase, imunotoxinas direccionadas ao ligando, oligonucleotídeos antisense têm sido estudados clinicamente. Alguns destes foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) como fármacos secundários em diferentes tipos de carcinomas. ⁽⁴⁵⁾

Na primeira categoria de fármacos incluem-se os anticorpos monoclonais, destacando-se o cetuximab, embora o panitumumab e o trastuzumab sejam menos tóxicos em igual dosagem mas são menos imunogénicos e efectivos. ⁽⁴⁵⁾ O cetuximab, anticorpo monoclonal dirigido contra o EGFR foi a primeira molécula alvo aprovada em 2006 pela FDA para o tratamento local de carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço avançado em combinação com a radioterapia e na primeira linha de tratamento em casos de recorrência ou metástases juntamente com quimioterapia baseada em cis-platinum e 5-fluoruracil. ^(44,47) O cetuximab liga-se ao receptor do EGFR e induz a sua regulação, evitando assim qualquer ligação posterior ao receptor e activação dos ligandos. Em última análise, o bloqueio mediado por este anticorpo monoclonal resulta na inibição da proliferação celular. ⁽⁴⁶⁾ O anticorpo monoclonal cetuximab actua também competindo pela ligação ao EGFR e bloqueia a fosforilação e activação dos receptores associados às cinases, resultando assim na inibição do crescimento celular, indução da apoptose, e uma diminuição na produção de metaloproteinases e factor de

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

crescimento vascular endotelial.⁽⁴⁸⁾ Apesar de não ser directa, a inibição da ligação do ligante ao EGFR deixa o domínio extracelular com uma configuração fechada, inibindo assim a formação de homodímeros e heterodímeros.⁽⁴⁹⁾

O cetuximab representa uma opção viável de tratamento, uma vez que actua sinergicamente com as restantes modalidades de tratamento, aumentando o efeito dos fármacos citotóxicos, como o cisplatina (quimioterapia convencional baseada na platina-fluoruracil) e aumenta a apoptose induzida pela radioterapia. A radiação aumenta a expressão de EGFR nas células tumorais e o bloqueio da sua sinalização torna as células mais sensíveis aos efeitos da radiação.⁽⁵⁰⁾ É importante referir que o cetuximab não aumenta os efeitos tóxicos comuns associados à radioterapia da cabeça e do pescoço, como a mucosite, xerostomia, disfagia, dor, perda de peso.⁽⁵¹⁾

Bonner *et al.* reportam que a adição de cetuximab à radioterapia nos pacientes com CECCP oral avançado contribui para um aumento do controlo local da doença e sobrevida global.^(48,50) Ainda assim nestes pacientes a quimioterapia continua a ser o tratamento de eleição apesar dos seus efeitos adversos, como náuseas, vómitos, neutropenia e mucosite severa que se registam em mais de 50% dos pacientes.⁽⁴⁸⁾ As *guidelines* do tratamento do CECCP em pacientes com recorrência e metástases (estádios III e IV) incluem a quimioterapia baseada na platina como referência terapêutica. Nos pacientes onde a quimioterapia não está indicada, pacientes com mais de 70 anos, uma vez que nesta população a quimioterapia não demonstra um aumento na taxa de sobrevida global, a adição do cetuximab à radioterapia deve ser considerada para aumentar o tempo de sobrevida e o tempo até ao aparecimento de recorrência. O cetuximab em combinação com a quimioterapia baseada na platina é superior à quimioterapia em monoterapia nos pacientes com recorrência e metástases. Por sua vez a qualidade de vida não foi melhorada, nem diminuída com a adição do cetuximab à radioterapia.⁽⁴⁸⁾

Um estudo fase III realizado em 2006 no Departamento de Medicina da Universidade do Alabama demonstra que o tratamento loco-regional do carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço realizado com altas doses de radioterapia juntamente com cetuximab aumenta o controlo loco-

regional e reduz a mortalidade sem potenciar os efeitos tóxicos associados à radioterapia. ⁽⁵⁰⁾

Resultados de diversos ensaios clínicos estabeleceram a actividade do cetuximab no tratamento do CECCP. De forma geral os efeitos adversos associados ao cetuximab são considerados leves a moderados e clinicamente ultrapassáveis. O efeito adverso mais comum relacionado com o cetuximab é o rash cutâneo envolvendo acne e pústulas, observado em mais de 70% dos pacientes. O rash cutâneo aparece em zonas ricas em glândulas sebáceas, como a face, o pescoço, os ombros, o tronco e desaparece sem ser necessária intervenção farmacológica. ⁽³⁴⁾ Embora o rótulo do cetuximab indique que reacções graves de hipersensibilidade ocorrem em cerca de 3% dos pacientes, taxas mais elevadas têm sido relatadas em regiões geográficas distintas, como o sul dos Estados Unidos da América, Austrália e Sidney. ⁽³⁴⁾ Muitas destas reacções ocorrem imediatamente de seguida à toma do medicamento, compatível com as reacções mediadas por IgE. ⁽³⁴⁾ A hipomagnesémia pode também ocorrer, estando presente em 5-14% dos pacientes, devido à inibição da reabsorção do magnésio secundária ao bloqueio do EGFR. ⁽⁴⁷⁾

A segunda categoria de fármacos inclui a inibição do domínio de tirosina cinase do EGFR, usando pequenas moléculas como o gefitinib e o erlotinib. Estes inibidores têm demonstrado a sua eficácia, o erlotinib no carcinoma do cancro do pulmão e o lapatinib no carcinoma da mama HER-2 positivo.

Apesar destes agentes não inibirem o processo de dimerização eles conseguem inibir a sinalização após dimerização, uma vez ligados ao domínio intracelular de tirosina cinase do EGFR inibem a fosforilação o que leva à inibição da transdução do sinal, como demonstrado na figura 3. ^(28,34,47)

Influência do EGFR na carcinogênese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

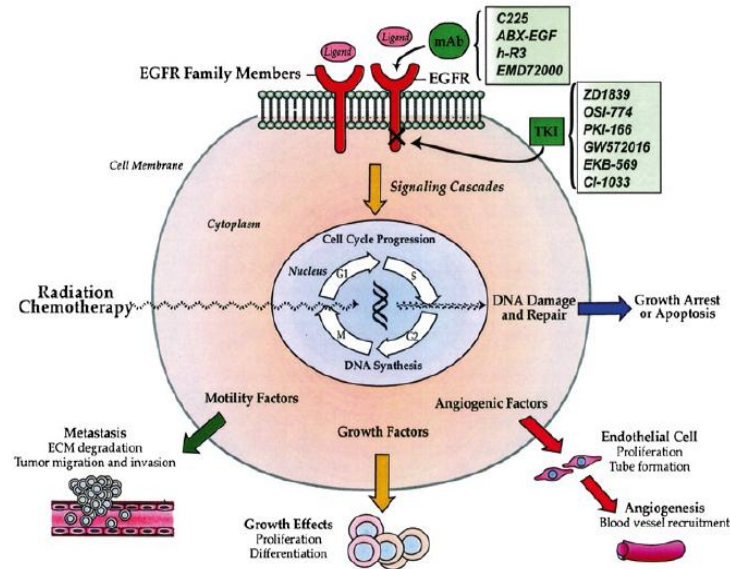


Figura 3 – Inibição do EGFR pelos anticorpos-monoclonais e pelos inibidores de tirosina cinase bem como os efeitos celulares e teciduais subsequentes. Figura adaptada do livro (Bernier J. Head and Neck Cancer. Springer 2011; 294).

Entre os inibidores da tirosina cinase dirigidos ao EGFR e aprovados pela FDA destacam-se o gefitinib, erlotinib e o lapatinib, moléculas que actuam como competidores reversíveis, competindo com adenosina trifosfato (ATP) para o domínio de ligação de tirosina cinase do EGFR. A inibição da activação do receptor resulta na inibição da sinalização e na redução da proliferação celular e sobrevivência. ⁽⁵²⁾

Algumas destas pequenas moléculas conseguem induzir a formação de homodímeros inactivos de EGFR e heterodímeros EGFR/HER2 (ErbB1/ErbB2). Assim, devido à homologia superior a 80% no domínio de tirosina cinase entre o EGFR (ErbB1) e o HER2 (ErbB2), algumas pequenas moléculas que competem por ATP conseguem bloquear a actividade catalítica de ambos os receptores. Estas pequenas moléculas conseguem ainda bloquear a actividade catalítica dos EGFR mutados e que não apresentam domínio extracelular. ⁽³⁷⁾

O gefitinib e o erlotinib são inibidores da tirosina cinase através de pequenas moléculas e podem ser administrados diariamente e por via oral, o que não é possível com os anticorpos monoclonais, cetuximab e o panitumumab. ^(34,46)

As terapêuticas moleculares de tumores que expressam o EGFR são um método específico comparativamente com a perda celular generalizada que ocorre com as terapêuticas citotóxicas convencionais. ⁽⁴⁷⁾ Contudo, o reconhecimento de resistência às terapias moleculares nos ensaios clínicos tem esbatido o entusiasmo inicial relativamente a este tratamento alvo. A resistência adquirida às terapêuticas alvo, nomeadamente anti-EGFR são resultado de vários mecanismos, como as mutações presentes e adquiridas ao longo do tratamento, a activação independente de vias de sinalização, ligações com outros receptores de tirosina cinase e a centralização de vias de sinalização, bem como factores ambientais incluindo agentes inflamatórios e infecções virais. ⁽⁵¹⁾

A resistência ao cetuximab tem sido associada à co-expressão do EGFRvIII, uma mutação que ocorre como resultado de uma deleção de exões 2-7 abrangendo o domínio de ligação extracelular. Esta deleção resulta num receptor mutado que se liga de forma independente. ^(47,51) A tirosina cinase desta forma mutante está constitutivamente activa mesmo na ausência do ligando. Apesar da actividade específica do EGFRvIII ser menor do que quando o receptor está activado pelo ligando, essa actividade aparenta ser suficiente para a malignidade celular. Anticorpos têm sido desenvolvidos uma vez que a deleção do exão 2-7 se traduz numa sequência única que pode ser utilizada para reconhecer células que expressam essa forma mutada. ⁽⁴⁰⁾ A expressão do EGFRvIII tem sido detectada em 42% dos pacientes com carcinoma espinho celular da cabeça e do pescoço, e está relacionada com o aumento da proliferação celular *in vitro* e o aumento do crescimento tumoral.

Relativamente aos inibidores de tirosina cinase e ao desenvolvimento de resistências, estes demonstram resultados limitados em pacientes com CECCP. Têm sido apontados quatro mecanismos que visam explicar a resistência a este grupo farmacológico: mutações a nível do Ras e K-ras, transição epitélio-mesenchima, aumento na regulação da Ciclina D1 e sinalização dominante da via PI3/cinase. ⁽⁵²⁾

Um estudo realizado no Departamento de Oncologia Humana na Universidade de Wisconsin pretendeu estudar a inibição do EGFR quando combinado um anticorpo monoclonal e um inibidor da tirosina cinase, visando assim afectar ambos os domínios extracelular e intracelular deste

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

receptor. A inibição do EGFR de forma combinada utilizando o cetuximab mais o erlotinib ou o gefinitib foi potenciada e maior do que quando feita por cada grupo individualmente. Esta informação sugere que após o estabelecimento de resistência das células ao cetuximab, os inibidores da tirosina cinase continuam com capacidade de inibir o crescimento de células tumorais, modulando a sinalização intracelular, que não foi completamente conseguida com o bloqueio extracelular. Assim, pode concluir-se que o tratamento com inibidores do EGFR distintos pode aumentar a potência de inibição da sinalização do EGFR. ⁽⁴³⁾

Apesar do papel crítico desempenhado pelo EGFR no desenvolvimento dos carcinomas espinho-celulares da cabeça e do pescoço, apenas benefícios clínicos modestos têm sido verificados no controlo loco-regional e sobrevivência dos pacientes tratados com esta terapia alvo EGFR. ⁽⁵¹⁾

14 - Conclusões e Perspectivas Futuras

Em virtude de todos os factos mencionados anteriormente, pode concluir-se que o estudo do cancro oral é bastante abrangente e desafiante. Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas o prognóstico dos pacientes com carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço continua mau. De uma forma geral, tendo em conta os factores de risco e as suas implicações no desenvolvimento do carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço pode afirmar-se que um dos principais objectivos é a consciencialização por parte dos pacientes e dos profissionais de saúde do papel desempenhado pelos factores de risco, sinais e sintomas. Na impossibilidade de reduzir os factores de risco, como o tabaco e o álcool e de agir de forma preventiva, o diagnóstico deve ser feito o mais precocemente possível. Relativamente aos factores de risco, a cessação tabágica e de consumo de álcool não pode ser desvalorizada, uma vez que estes são factores essenciais no desenvolvimento primário e também secundário desta patologia.

Os profissionais de saúde, e particularmente os Médicos Dentistas desempenham um papel determinante no diagnóstico do cancro oral. Um exame completo da cavidade oral e da orofaringe deve ser prática comum em todos os pacientes, tendo o Médico Dentista a obrigação de adoptar o chamado exame oportunista. Assim que esta prática se adquire, é facilmente exequível, não tomando muito tempo de consulta, mas é de extrema importância. Neste exame, são fundamentais, a observação detalhada de todas as estruturas e tecidos e a palpação. Se detectarmos uma lesão suspeita que após observação e remoção dos factores que podem estar na sua etiologia não cicatriza, deve ser feita de imediato uma biópsia e enviada para a anatomia patológica. Obtido o resultado daquele exame o paciente deve ser, imediatamente, encaminhado para um Médico especialista.

A radioterapia, cirurgia e a quimioterapia têm sido referências terapêuticas no que concerne ao tratamento dos carcinomas espinho-celulares da cabeça e do pescoço. Presentemente num esforço para alcançar maior eficácia, reduzir a toxicidade e prevenir a resistência a essas terapias, combinações de terapias convencionais e terapias alvo tem sido o principal foco da investigação terapêutica.

É fundamental referir que vários marcadores moleculares da doença foram encontrados e estão activamente validados, como a infecção por HPV e o EGFR. Estes são alguns dos principais candidatos para o desenvolvimento de novos diagnósticos e novas estratégias terapêuticas. Relativamente à positividade do HPV no carcinoma espinho celular da cabeça e do pescoço este confere um prognóstico favorável em termos de sensibilização à radioterapia, recorrência e mortalidade global. Pode-se concluir que o HPV é um marcador viável que pode ser usado no diagnóstico, mas assumindo ainda maior importância para estratificar os pacientes de risco e ajudar directamente a escolha da melhor terapêutica baseada no comportamento da doença e prognóstico. Correntemente, este é o marcador molecular de diagnóstico e prognóstico mais válido e robusto no carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço. Tomando em consideração que o principal objectivo deste trabalho era compreender a influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo, este biomarcador apresenta-se bastante promissor e é um indicador de prognóstico negativo.

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

A compreensão da sua biologia molecular levou ao aparecimento de terapias alvo significantes como os anticorpos monoclonais (cetuximab) e os inibidores de tirosina cinase. Ainda assim, até agora só o cetuximab foi aprovado pela FDA para duas situações clínicas específicas, como agente sensibilizante à radioterapia em pacientes que estão a fazer radioterapia pela primeira vez e, para pacientes com recorrência e metástases.

Contudo, é clara a necessidade de optimização da sua utilização uma vez que como agente único a sua eficácia para além de promissora, é limitada. Existem algumas dificuldades a ultrapassar, como a realização de estudos mais precisos, nomeadamente na selecção dos pacientes, uma vez que ainda não foi possível quantificar o nível de EGFR expresso necessário para que se verifique resposta clínica positiva a estas terapias. Os ensaios fase II são conduzidos em pacientes com doença loco-regional avançada e recorrência/metástases o que levanta uma série de limitações, uma vez que estes pacientes já fizeram tratamento prévio com quimioterapia, radioterapia e cirurgia, e muitas vezes é desenvolvida resistência e o tumor não responde com a mesma eficácia a estes novos agentes testados. É imperativo que a terapia alvo seja estudada como primeira abordagem terapêutica para que se verifique uma melhor resposta clínica. Assim, independentemente do nível de expressão do EGFR, as principais vias de sinalização podem também estar activadas por outros receptores, influenciando a resposta terapêutica. Constata-se a necessidade urgente de fazer uma reavaliação do valor preditivo dos modelos pré-clínicos actualmente utilizados e projectos de novos estudos, em que a disparidade dos modelos pré-clínicos não seja tão acentuada relativamente à clínica. Outro dos desafios inerentes é determinar as populações de pacientes em que esta terapêutica trará maior benefício, para justificar o custo elevado destes novos fármacos. Quando todas as questões relativamente às investigações clínicas e à população alvo estiverem ultrapassadas é que se ficará a conhecer o verdadeiro potencial destes marcadores biológicos como ferramentas no diagnóstico molecular e potencial clínico no carcinoma espinho-celular da cabeça e do pescoço.

O desenvolvimento futuro destes novos agentes biológicos terapêuticos dever-se-á focar na busca da inibição de vários alvos simultaneamente, como os inibidores da tirosina cinase, ou na combinação de diferentes

agentes que actuem em vias de sinalização distintas com vista a evitar a fuga das células tumorais por mecanismos alternativos, levando a um maior controlo da doença. O aparecimento de novas tecnologias de imagem juntamente com tecnologias proteómicas seriam bastante úteis na detecção tumoral precoce, para se conseguirem diagnosticar e eliminar os tumores antes de estes obterem capacidade de sobrevivência e conseguirem resistir à terapia.

Para finalizar, o desafio maior já foi positivamente atingido, uma série de carcinomas avançados demonstraram respostas objectivas à monoterapia com uma variedade de agentes anti-EGFR, contudo ainda surgem constantemente respostas variáveis em diversos ensaios clínicos. É necessário optimizar os ensaios clínicos, a sua transposição clínica e fazer o paralelo com o que já se verifica para outros tipos de cancro, nomeadamente o cancro da mama. O último e principal objectivo será atingido quando a utilização destes agentes terapêuticos com base nas terapias moleculares trouxerem resultados positivos ao panorama clínico diário, especialmente quando conseguirem melhorar a detecção e o diagnóstico destas lesões o mais precocemente possível.

15 – Agradecimentos

Ao meu Orientador, Professor Fernando Guerra pela oportunidade concedida.

Ao meu Co-orientador, Dr. Francisco Marques, pela disponibilidade e pelos valiosos conhecimentos e ensinamentos, pelo interesse e apoio no desenrolar deste trabalho.

À Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pelo material bibliográfico disponibilizado.

16 - Bibliografia

- 1- Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncology* 2007; 43:523-534.
- 2- Shuptrine CW, Surana R, Weiner LM. Monoclonal Antibodies for the treatment of cancer. *Seminars in Cancer Biology* 2012; 22:3-13.
- 3- Barasch A, Coke JM. Cancer therapeutics: an update on its effects on oral health. *Journal of Periodontology* 2007; 44 (1):44-54.
- 4- Bunnell A, Pettit N, Reddout N, Sharma K, O`Malley S, Chino, M. Analysis of primary risk factors for oral cancer from select US states with increasing rates. *Tobacco Induced Diseases* 2010; (3):8-5.
- 5- Jemal A, Siegal R, Naishadham D, Cancer Statistics, 2012. CA: A cancer Journal for Clinicians 2012 January/February; 62 (1):10-29.
- 6- Mydlarz KW, Hennessey PT, Califano JA. Advances and Perspectives in the Molecular Diagnosis of Head and Neck Cancer. *National Institute of Health* 2010 January 1; 4(1): 53-65.
- 7- Siegal R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer Statistics 2011 The impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities on Premature Cancer Deaths. *Cancer Journal for Clinicians* 2011 July/August; (61) 4.
- 8- Molinono A, Amornphimoltham P, Squarize CZ, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated Molecular Networks in Head and Neck Carcinogenesis. *Oral Oncology* April 2010; 45(4-5):324-334.
- 9- Walker DM, Boey G, McDonald LA. The pathology of oral cancer. *Pathology of Oral Cancer* 2003 October 35(5): 376-383.
- 10- Piemonte ED, Lazos JP, Brunotto M. Relationship between chronic trauma of the oral mucosa, oral potentially malignant disorders and oral cancer. *Journal of Pathology & Medicine* 2010; 39:513-517.
- 11- Kademani D. Oral Cancer. *Symposium on Solid Tumors* 2007 July; 82(7):878-887

- 12- Almeida VL, Leitão A, Reina LDC, Montanari CA, Donnici CI, Lopes M. Cancro e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. 2004 February.
- 13- Johnson N. Tobacco Use and Oral Cancer: A Global Perspective. *Journal of Dental Education* 2001 April; 65 (4): 328-328.
- 14- Chocolatewala N, Chaturvedi P, Desale R. The role of bacteria in oral cancer. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology* 2010 October-December 31(3):126-131.
- 15- Robert A, Blanchart RH, editors. Oral Cancer – The Dentist`s Role in Diagnosis, Management, Rehabilitation and Prevention. Quintessence Publishing Co Inc 2000.
- 16- Ruiz MT, Bertelli EP, Mamiglia JV, Ruback MJC, Bertollo EN. Head and neck cancer epidemiology biomarkers. *Arq Ciência Saúde* 2006 January; 13(1):34-8.
- 17- Huang S, Armstrong EA, Benavente S, Chinnaiyan P, Harari PM. Dual-agent Molecular Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR): Combining Anti-EGFR Antibody with Tyrosine Kinase Inhibitor. *American Association for Cancer Research* 2012 January 7; 5355-5362.
- 18- Pelucchi C, Silvano G, Garavello W, Bosetti C, Vecchia C. Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Research & Health* 2006; 29 (3): 193-198.
- 19- Argiris A, Ferris RL, Karamouzis MV, Raben D. Head and neck cancer seminar. www.thelancet.com 2008 May; Vol 371.
- 20- Hermans R, editor. Squamous Cell Cancer of the Neck; Contemporary Issues in Cancer Imaging –Cambridge University Press 2008
- 21- Demathe A, Garcia JF, Mattar N, Simonato L, Miyahara GI. Human papillomavirus (HPV) detection in lip squamous cell carcinoma: correlation with clinical aspects and risks factors. *Revista Brasileira Epidemiologica* 2011; 14(1):98-105.
- 22- Ruiz MT, Bertelli EP, Mamiglia JV, Ruback MJC, Bertollo EN. Head and neck cancer epidemiology biomarkers. *Arq Ciência Saúde* 2006 January; 13(1):34-8.
- 23- Syrjanen S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Annals of Oncology* 2010 October; 21 (7):244-247.

Influência do EGFR na carcinogênese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

- 24- Pfister DP, Kie-Kian Ang, Brizel DM, Burtress BA, Dimitrios C, Dunphy F et al. Head and Neck Cancers – Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 2011; 9:596-650.
- 25- Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, Winn DM, Smith EM, Shan`gina O, Schwartz ST, Purdue MP. et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the Internacional Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Internacional Journal of Epidemiology* 2010; 39:166-181.
- 26- Colombo J, Rahal P. Genetic Changes in Head and Neck Cancer. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2009; 55(2):165-174.
- 27- Moura S, Catão MH, Gerbi M, Sales M, Costa L. Biologic Markers in Oral Cancer. *International Journal of Dentistry Recife* 2006 April; 1(2):58-62.
- 28- Ziogas DE, Katsios C, Roukos DH. From traditional molecular biology to network oncology. *Future Oncology* 2011; 7(2) 155-159.
- 29- Tavares A, Perdigão J. Ciclo Celular e novas terapias contra o cancro (o ano do Nobel). *Boletim de Biotecnologia*
- 30- Reuter CWN, Morgan MA, Eckardt A. Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *British Journal of Cancer* 2007; 96, 408-416.
- 31- Pitot HC. The Molecular Biology of Carcinogenesis. Presented at The American Cancer Society National Conference – Cancer Supplement 1993 August 1; 72 (3): 962-970.
- 32- Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz L, Lopes C. Chemical Carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2007; 79(4): 593-616.
- 33- Pitot HC, Dragan Y. Facts and theories concerning the mechanism of carcinogenesis. *The FASEB Journal* 1991 June 1; 5:2280-2287.
- 34- Bernier J, editor. *Head and Neck Cancer*. Springer Science Business Media 2011; p.294.
- 35- Pitot HC. Progression: The Terminal Stage in Carcinogenesis. *Journal Cancer Research* 1989 July; 80; 599-607.
- 36- Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* 2011 March 4; 646-674.

- 37- Mendelsohn J, Baselga J. Status of Epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in the Biology and Treatment of Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2003 July 15; 21:2787-2799.
- 38- Ratushny V, Astsaturov I, Burtness BA, Golemis EA, Silverman JS. Targeting EGFR resistance networks in head and neck cancer. *Elsevier* 2009; 1255-1269.
- 39- Leemans CR, Boudewijn JM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* January 2011 January; (11)9-22.
- 40- Haley JD, Gullick WJ, editors. *EGFR Signaling Networks in Cancer Therapy*. New York. Humana Press; 2008.
- 41- Szabó B, Nelhubel GA, Kárpáti A, Kenessey I, Jóri B, Székely C. Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncology Elsevier* 2010 November 14; (47).
- 42- Patel D, Bass R, Hooper A, Prewett D, Kang X. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab inhibits EGFR/HER-2 heterodimerization and activation. *International Journal of Oncology* 2009 September 9; (34) 25-32.
- 43- Huang S, Armstrong EA, Benavente S, Chinnaiyan P, Harari PM. Dual-agent Molecular Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR): Combining Anti-EGFR Antibody with Tyrosine Kinase Inhibitor. *American Association for Cancer Research* 2012 January 7; 5355-5362.
- 44- Tourneau C, Faivre S, Siu LL. Molecular targeted therapy of head and neck cancer: Review and clinical development challenges. *European Journal of Cancer* 2007; 43 2457-2466.
- 45- Matta A, Ralhan R. Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck Oncology* 2009 March 2; 1-8.
- 46- Moon C, Chae YK, Lee J. Targeting epidermal growth receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab. *Experimental Biology and Medicine* 2010, 235:907-920.
- 47- Agulnik M. *New approaches to EGFR inhibition for locally advanced or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN)*. Springer 2012 Jan 18.

Influência do EGFR na carcinogénese oral e no desenvolvimento de terapias alvo

- 48-Cripps C, Winqvist E, Devries MC, Norman S, Gilbert R. Epidermal growth factor receptor targeted therapy in stages III and IV head and neck cancer. *Current Oncology* 2010; 17 – 3.
- 49- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2006;354:567– 578.
- 50- Elferink LA, Resto VA. Receptor-Tyrosine-Kinase-Targeted Therapies for Head and Neck Cancer. *Journal of Signal Transduction Corporation*, 2011 April 5; 1-11.
- 51- Ziogas DE, Katsios C, Roukos DH. From traditional molecular biology to network oncology. *Future Oncology* 2011; 7(2) 155-159.
- 52- Baba Y, Fujii M, Tokumaru Y, Kato Y. Present and Future of EGFR Inhibitors for Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Journal of Oncology* 2012 January; 202: 1-9.