

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS
TRANSPORTADORAS DE GLICOSE (GLUT-1 E GLUT-3):
RELAÇÃO COM OS ACHADOS DO PET SCAN (CÂNCER
DE CABEÇA E PESCOÇO E OVÁRIO) E ASSOCIAÇÃO
COM FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS EM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL**

FERNANDA ROCHA ROJAS AYALA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Co-orientador: Dr. Eduardo Nóbrega Pereira Lima

São Paulo

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Ayala, Fernanda

Análise da expressão das proteínas transportadoras de glicose (GLUT-1 e GLUT-3): relação com os achados do pet scan (câncer de cabeça e pescoço e ovário) e associação com fatores clínico-patológicos em carcinoma epidermóide bucal / Fernanda Ayala – São Paulo, 2007.

108p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CARCINOMA EPIDERMÓIDE. 2. CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO. 3. CÂNCER DE OVÁRIO. 4. PROTEÍNAS GLUT. 5. PET SCAN. 6. IMUNOHISTOQUÍMICA.

Se o final é doce, por que não ter um início amargo?

(William Sheakespeare)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Marciano e Gal, pelo esforço em
sustentar os meus sonhos.*

Á minha irmã Mariana, por sua companhia e paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, por sua orientação, confiança, dedicação e paciência. Por ter me proporcionado a grande oportunidade de fazer parte do seu grupo de estudo. Por ser um orientador sempre prestativo, oferecendo todo o suporte necessário para o desenvolvimento desse trabalho.

Às minhas **amigas Sunnie Grace, Flávia Pascoal, Marina Werneck, Elvira Monteiro, Mariana Muller e André Melo**, pelos momentos de apoio e descontração, desabafos e incentivo em minha jornada e, principalmente, pela amizade sincera cultivada durante todos esse tempo.

Aos **amigos Yukie Sato, Edaise Maria da Silva, Gilmara Santos da Silva, Alexandra Cardozo Longo e André Silva, Maria Cristina Rodrigues Rangel e Nadia Pereira de Castro**, pelo companheirismo, apoio, risos, conselhos, que tornaram todos esses dias mais prazerosos.

Aos **colegas Fabiana Facco Casarotti, César Eugênio Nascimento Braga, Ângela Maria Brevemrigues, Mariza Santana Malhado e Carlos Ferreira Nascimento**, pela competência e excelência na preparação do material e realização das reações de imunoistoquímica.

As funcionárias da Pós-Graduação, **Ana Maria Alves Kuninari, Márcia Miwa Hiratani e Luciana Pitombeira**, pela paciência, atenção e auxílio oferecidos durante o desenvolvimento desse estudo.

Aos membros da Banca de Qualificação **Dra. Ângela Logullo e Dr. Jefferson Luiz Gross**, pelas críticas e sugestões construtivas que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Imunoistoquímica, **José Ivanildo Neves, Maria Nazaré de Fátima Ferreira, Ozires Pereira Santos e Simone Cristiane Pagotty**, pelo auxílio durante a realização das reações de imunoistoquímica.

Ao **Drs. Eduardo Pereira Lima, André Lopes Carvalho e José Humberto Fregnani**, pela paciência e presteza nas análises estatísticas e pelos esclarecimentos das minhas dúvidas durante o desenvolvimento desse trabalho.

Á toda equipe da **Biblioteca**, pela presteza durante as pesquisas bibliográficas e pela formatação desse trabalho.

Á Sra. **Hirde Cortesini** e demais funcionários do Serviço de Arquivo Médico do Hospital do Câncer, pelo auxílio e paciência durante levantamento dos dados nos prontuários médicos.

Aos colegas de Pós-Graduação do Departamento de Anatomia Patológica, principalmente a **Dr. Isabela Werneck da Cunha**, que contribuiu para o amadurecimento das minhas idéias, sempre tentando acrescentar o melhor a esse trabalho.

Á todos do Departamento de Anatomia Patológica, funcionários e residentes, principalmente, **Andreza Maria da Rocha e Eliana dos Santos**, que de alguma forma, colaboraram para a conclusão desse estudo.

Á **CAPES e FAPESP**, pelo suporte financeiro indispensável para o desenvolvimento desse projeto.

E, finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da elaboração desse estudo, gostaria de expressar o meu mais profundo agradecimento.

RESUMO

Ayala F. **Expressão das proteínas transportadoras de glicose (GLUT-1 e GLUT-3): relação com os achados do Pet Scan (câncer de cabeça e pescoço e ovário) e sua associação com fatores clínico-patológicos em carcinoma epidermóide bucal.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Uma das características comuns em neoplasias humanas é o aumento do metabolismo glicolítico que serve para que as células neoplásicas se multipliquem. Entre os mecanismos que contribuem para esse fenótipo glicolítico, a expressão das proteínas transportadoras de glicose, especialmente a GLUT-1 e GLUT-3, têm sido encontrada em uma variedade de tumores, incluindo CECP e ovário. Recentemente, a avaliação do metabolismo glicolítico em tumores através do exame de imagem FDG-Pet Scan tem sido usada para identificar tumores particularmente agressivos. O objetivo desse estudo foi analisar a expressão dessas proteínas envolvidas na captação de glicose pela célula, verificar a sua influência nos resultados de Pet Scan e sua associação com variáveis clínico-patológicas e sobrevida dos pacientes portadores de CECP oral.

Métodos: As análises retrospectivas da expressão de GLUT-1 e GLUT-3 foram avaliadas em dois grupos distintos de pacientes. O primeiro deles foram àqueles reconhecidos a partir do Departamento de Imagem, Setor de Medicina Nuclear, Hospital A C Camargo, 30 casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e 24 casos de neoplasia ovariana. O segundo foi a partir de uma série retrospectiva de pacientes portadores de CEC da cavidade oral, oriundos do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do mesmo hospital. Para o primeiro grupo de pacientes foram feitas análises imunoistoquímicas em lâminas convencionais. Para o segundo grupo, confeccionou-se um *tissue micro array* (TMA) a partir de 151 casos

de CECP levantados de nossos arquivos. Esses últimos casos foram analisados em duplicata, contendo 302 cilindros. A análise imunoistoquímica foi realizada pela técnica da estreptavidina-biotina peroxidase. As análises do TMA foram feitas baseadas no local da marcação das células e na quantidade de células positivas. A frequência de células marcadas foi classificada baseado no nível de corte de 85% de células positivas para o biomarcador. Nos casos de corte convencional, a análise foi baseada num sistema de escore definido pelo produto da intensidade da reação e número de células positivas. Para as análises de associação entre as variáveis consideradas, verificou-se os métodos de χ^2 ou teste exato de Fisher. Para as análises de sobrevida global, o cálculo foi realizado pela técnica de Kaplan-Meier e as comparações entre as curvas de sobrevida, pelo teste de Log-rank. A análise multivariada foi feita pelo modelo de riscos proporcionais de Cox. Foi considerado o nível de significância de 5%. **Resultados:** Nossos resultados em relação ao primeiro grupo de pacientes aqui estudados mostraram uma expressão positiva para GLUT-1 (91,7%) na membrana das células de tumores CECP. E 16,7% de expressão positiva para GLUT-3 na membrana das células desse tumor. Os resultados mostraram uma boa concordância entre a proteína GLUT-1 e os achados desse exame de imagem. Em relação à proteína GLUT-3, houve uma fraca correspondência. Para os pacientes portadores de neoplasia ovariana, encontramos GLUT-1 expressa na membrana das células (87%). Para a proteína GLUT-3, foi 21,7% de expressão positiva na membrana das células. Houve boa relação entre a proteína GLUT-1 e os resultados do Pet Scan. A proteína GLUT-3, mostrou uma fraca relação com o Pet Scan. Para os pacientes analisados através da técnica de TMA, mostraram uma associação significativamente positiva entre a expressão do padrão de GLUT-1 com o gênero do paciente ($p=0,017$), consumo de álcool ($p=0,004$). Nenhuma associação da expressão padrão de GLUT-1 com o estadiamento clínico foi encontrada, nem com a embolização vascular. Foi observada a existência de associação significativa negativamente entre a expressão de GLUT-3 e o estadiamento clínico ($p=0,005$) e com a embolização vascular ($p=0,005$). Em relação ao número

de células marcadas, foi observada uma forte associação significativa entre GLUT-1 e o gênero do paciente ($p=0,001$), estadiamento clínico ($p=0,028$). Não foi observada qualquer associação significativa com a embolização vascular. Houve uma tendência de associação entre a expressão de GLUT-1 e GLUT-3 ($p=0,059$). Em relação à sobrevida global, foi observada uma associação significativa com a expressão de padrão agrupado (M e MN/N) ($p=0,015$) e estratificado de GLUT-1 ($p=0,041$) e também com a proteína GLUT-3 ($p=0,002$). Foi observada uma associação significativa entre a sobrevida livre de doença e a expressão da proteína GLUT-3 ($p=0,021$). Pela análise multivariada, observou-se que o estadiamento clínico ($p=0,006$) permaneceu como fator de prognóstico independente para recorrência. A embolização vascular ($p=0,003$), a expressão de GLUT-1 (M e MN/N) ($p=0,006$) e a expressão de GLUT-3 ($p=0,018$) permaneceram como fatores prognósticos independentes para óbito. **Conclusão:** No presente trabalho, verificamos que o exame de Pet Scan independe da expressão de GLUT-1 e GLUT-3 para a detecção de carcinomas da cabeça e pescoço e de ovário. Em CECB bucal, a presença da expressão nuclear de GLUT-1 se associa com o maior consumo de álcool e pior sobrevida global. A presença da expressão de GLUT-1 ocorre mais freqüentemente em carcinoma epidermóide da boca do que a GLUT-3. Pela detecção imunoistquímica de GLUT-3 e através das análises estatísticas, tanto univariada quanto multivariada, ele é um fator de pior sobrevida global assim como GLUT-1 e embolização vascular.

SUMMARY

Ayala F. [Expression of glucose transporter proteins (GLUT-1 e GLUT-3): relation with Pet Scan findings (head and neck and ovary cancer) and association with clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma]. São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Increased glycolytic metabolism has been established as a characteristic of malignant cells. Among the mechanisms that contribute to the glycolytic phenotype, overexpression of glucose transporters, and especially of GLUT-1 and GLUT-3, has been reported for a large variety of tumors, including squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) and ovary. Recently, the clinic introduction of positron emission tomography (FDG-PET) provided a means for a noninvasive quantitative assessment of tumor glucose metabolism *in vivo*. It has been used to identify aggressive tumors. This study was designed initially to measure GLUT-1 and GLUT-3 expression with immunologic techniques involved in the uptake cell glucose in archival specimens of SCCHN and ovary cancer, verifying their influence in the Pet Scan findings. Also, to study the association with clinicopathological features and survival of the oral SCC patients. **Methods:** The retrospective analyses of the GLUT-1 and GLUT-3 expressions were evaluated in two distinct groups of patients. The first one, were specimens retrieved from the Image Department of Nuclear Medicine, A C Camargo Hospital, 30 cases of SCCHN and 24 cases of ovarian cancer. The second one, were specimens retrieved from the pathology archives with oral SCC (OSCC), obtained from the Head and Neck Department from the same hospital. For the first group, was submitted immunohistochemical analysis in conventional slides. For the second group, was made the tissue micro array (TMA) from 151 cases of oral SCC from our archives. These were analysed

in duplicate, including 302 cores. The immunohistochemical analysis were achieved by avidin-biotin technique. The criteria for analysis for TMA were based on site of the immunostaining in the cells and also in the frequency of 85% of the positive cells. According to analysis of conventional slides, was based on a score system defined by the product of intensity and frequency of positive cells. Statistical analyses were performed using chi-square or Fisher's tests. Survival curves were constructed according to the method of Kaplan-Meier. For differences between curves, the *P* value was calculated using the long rank test. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant. A multivariate COX regression analysis was performed to assess the prognostic significance of different staining patterns and their relationship with other pathological variables. **Results:** In the first group of patients, 91,7% of the cases were GLUT-1 overexpression in the cell membrane of SCCHN. The positive GLUT-3 expression was seen in 16,7% of the patients in the cell membrane of this tumor. Their relationship with Pet Scan findings in SCCHN, showed a good concordance between GLUT-1. Unlike GLUT-1 protein, the GLUT-3 protein showed low relation with Pet Scan exam. Additionally, the patients that exhibited ovary cancer were closely related to GLUT-1 overexpression in the membrane of the cells (87%). The GLUT-3 expression was found a low positivity in the membrane of the cells (21,7%). In relation to Pet Scan findings, it was found a good correspondance with GLUT-1. A weak relation was found with GLUT-3 expression and Pet Scan. For the second group of patients, analysed by TMA technique: the pattern of GLUT-1 expression showed significant association with patients gender ($p=0,017$), showing a strong association with male sex ($p=0,008$) and alcohol consumption ($p=0,004$), when in group of pattern expression (M e MN/M) ($p=0,042$). No statistical association was found neither between GLUT-1 expression and clinical staging, nor vascular embolization. Although, the patients with positive expression of GLUT-3 expression showed negative significance statistical between clinical staging ($p=0,005$) and vascular embolization ($p=0,005$). In relation to the proportion of positive cells, was observed a strong association between GLUT-1 and patients gender as well

as clinical staging ($p=0,028$). No statistical association was found between GLUT-1 expression and vascular embolization. There was not significant association between GLUT-1 and GLUT-3 expression, although showed trends to significance. Besides, there was an association between overall survival and GLUT-1 (M e MN/N) ($p=0,015$), and stratified group ($p= 0,041$), and also with GLUT-3 ($p=0,002$). The positive expression of GLUT-3 was associated with free disease survival ($p=0,021$). In multivariate analysis, only the clinical staging ($p=0,006$), persisted as independent prognostic marker of relapse. The vascular embolization ($p=0,003$), GLUT-1 expression (M e MN/N) ($p=0,006$) and GLUT-3 expression ($p=0,018$) remaining as independent prognostic markers of overall survival. **Conclusion:** In the present study, we observed that the detection of recurrent tumor by Pet Scan in SCCHN and ovary cancer no needing of GLUT-1 and GLUT-3 expression. According to our data, the nuclear expression patterns of GLUT-1 is associated with the major alcohol consumption and poor survival as well as GLUT-3 positive expression is a factor of free disease survival, which could be useful prognostic markers. We also demonstrated that the presence of GLUT-1 overexpression occurs more frequently in OSCC than GLUT-3. Furthermore, other clinicopathological parameters like clinical staging indicated that vascular embolization as well as GLUT-1 expression patterns and GLUT-3 expression to be potentials prognostic factors to death that it was noticed by the multivariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço	23
Figura 2	Adenocarcinoma seroso de ovário	23
Figura 3	Construção do <i>Tissue Microarray</i>	27
Figura 4	GLUT-1: Imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de CECP	39
Figura 5	GLUT-3: Imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de CECP	40
Figura 6	GLUT-1: Imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de adenocarcinoma metastático de ovário	46
Figura 7	GLUT-1: Imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de adenocarcinoma metastático de ovário	47
Figura 8	GLUT-3: Imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de adenocarcinoma metastático de ovário	48
Figura 9	GLUT-1: Imunoistoquímica mostrando marcação de GLUT-1 em CECP	56
Figura 10	Gráfico da expressão imunoistoquímica de GLUT-1 em CECP	57

Figura 11	GLUT-1: Expressão imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de CECP (TMA).	58
Figura 12	GLUT-3: Expressão na membrana das células de CECP	59
Figura 13	Curva de Sobrevida Global dos casos de CECP oral estudados	67
Figura 14	Influência da expressão dos marcadores nas curvas de sobrevida Global em CECP. (a) GLUT-1; (b) GLUT-3	68-69
Figura 15	Curva de Sobrevida livre de doença em CECP	70
Figura 16	Influência da expressão de GLUT-3 na curva de sobrevida livre de doença	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas dos 30 casos de CECP analisados nesse estudo	21
Tabela 2	Resultado geral dos marcadores em 24 casos de CECP avaliáveis	38
Tabela 3	Distribuição da expressão de GLUT-1/GLUT-3 de acordo com os achados do Pet Scan nos casos de CECP em pacientes com doença.	42
Tabela 4	Distribuição da expressão de GLUT-1/GLUT-3 de acordo com os achados do Pet Scan nos casos de CECP em pacientes sem doença	43
Tabela 5	Distribuição da expressão de GLUT-1/GLUT-3 de acordo com os achados do Pet Scan nos casos de CECP em pacientes com doença.	43
Tabela 6	Resultado geral dos marcadores em 23 casos de ovário metastático	45
Tabela 7	Distribuição da expressão de GLUT-1/GLUT-3 de acordo com os achados do Pet Scan em pacientes com recorrência ovariana.	50
Tabela 8	Distribuição da expressão de GLUT-1/GLUT-3 de acordo com os achados do Pet Scan em recidivas ovarianas	51
Tabela 9	Sumário dos dados clínico-patológicos dos 142 casos de CECP da cavidade oral analisados nesse estudo	53
Tabela 10	Resultado geral dos marcadores em 142 casos de CECP oral	60

Tabela 11	Análise da associação entre a expressão de GLUT-1 e fatores clínico-patológicos em CECp	64
Tabela 11a	Análise da associação entre a expressão de GLUT-1 e fatores clínico-patológicos em CECp	64
Tabela 11b	Análise da associação entre a expressão de GLUT-1 e fatores clínico-patológicos em CECp	65
Tabela 11c	Análise da associação entre a expressão de GLUT-1 e fatores clínico-patológicos em CECp	65
Tabela 12	Análise da associação entre a expressão de GLUT-3 e fatores clínico-patológicos em CECp	66
Tabela 13	Análise da associação entre os marcadores GLUT-1 e GLUT-3	67
Tabela 14	Análise multivariada, pelo modelo de regressão de Cox em relação à sobrevida livre de doença	72
Tabela 15	Análise multivariada, pelo modelo de regressão de Cox em relação à sobrevida global	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Critérios para gradação da expressão de GLUT-1, baseados na frequência de células coradas e intensidade de marcação (TMA)	29
Quadro 2	Critérios para gradação da expressão de GLUT-3, baseados na frequência de células coradas e intensidade de marcação (TMA)	29
Quadro 3	Cortes convencionais - Critérios para gradação da expressão de GLUTs (GLUT-1 e GLUT-3), baseados na frequência de células coradas e intensidade de marcação	30
Quadro 4	Cortes convencionais Critérios de classificação dos casos de acordo com a expressão de GLUTs	31

LISTA DE ABREVIATURAS

CECP	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
FDG	Fluorodeoxiglicose
GLUT	Glucose transporter
HE	Hematoxilina-eosina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PET	Tomografia de emissão de pósitron
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
TMS	Transmembranares
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNM	Tumor Nódulo Metástase

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Proteínas transportadoras de glicose	2
1.1.1	Aspectos de biologia básica	2
1.1.2	Função da GLUT	4
1.1.3	GLUT e prognóstico nas neoplasias	5
1.2	Câncer de Ovário	6
1.3	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP)	9
1.4	O método de Pet Scan e sua relação com as proteínas transportadoras de glicose	12
2	OBJETIVOS	16
3	CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Pacientes e amostras	19
3.1.1	Pacientes submetidos ao exame de Pet Scan	19
3.1.2	Pacientes com CECP de boca	24
3.2	Construção do arranjo tecidual em matriz (tissue microarray-TMA)	25
3.3	Método e análise das reações imunoistoquímica	27
3.4	PET-SCAN/CT	31
3.4.1	Protocolo PET-CT não dedicado	32
3.5	Análise estatística	33
4	RESULTADOS	35
4.1	Dados clínico-patológicos: caracterização da amostra	36
4.1.1	Pacientes submetidos ao Pet Scan	36
4.1.2	Análise da expressão de GLUT e CECP da boca	51
4.2	Análise da expressão imunoistoquímica	54

4.2.1	Perfil da expressão de GLUT-1 e GLUT-3	54
4.2.2	GLUT-1 e GLUT-3: Associação com dados clínico-patológicos	60
4.2.3	Associação entre os marcadores GLUT-1 e GLUT-3	66
4.3	Análise de sobrevida global	67
4.3.1	Sobrevida global e expressão de marcadores	68
4.3.2	Sobrevida Livre de Doença	70
4.3.3	Sobrevida livre de doença e expressão dos marcadores	70
4.4	Análise multivariada	71
5	DISCUSSÃO	73
5.1	Proteínas transportadoras de glicose (GLUT-1 e GLUT-3) de acordo com os achados de Pet Scan	74
5.2	Associação clínico-patológica da expressão de GLUT-1 e GLUT-3 em CECP da boca	80
6	CONCLUSÕES	92
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de levantamento de prontuários

Anexo 2 Método para realização da técnica de imunoistoquímica

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE GLICOSE:

1.1.1 Aspectos de Biologia Básica

Um dos aspectos mais importantes para o crescimento tumoral é o mecanismo pelo qual as células se nutrem e obtém energia para o seu intenso metabolismo. Este fenômeno consiste na necessidade de captação de glicose para a célula, afim de que esta possa efetuar o seu metabolismo. A habilidade de transportar glicose através da membrana plasmática é um quadro comum para as células, desde simples bactérias, a neurônios altamente especializados. O transporte de açúcar facilitado é mediado por membros da família de transportadores de glicose (GLUT, do inglês *glucose transporter*) que formam um poro aquoso através da membrana onde o açúcar pode passar de forma passiva (energia-independente) (PARDRIDGE et al. 1990; HASHIRAMOTO et al. 1992). Como consequência, os poros podem somente transportar açúcares abaixo do seu gradiente de concentração. As GLUTs são glicoproteínas com 12 segmentos de domínios exofascial e endofascial transmembranares (TMS) (YOUNES et al. 1996), o que se acredita ser o resultado de uma duplicação intragênica das 6 unidades TMS primordiais (KUNKEL et al. 2003). A atividade desse transportador, portanto, não consome energia, atuando a favor do gradiente de concentração da glicose (KLEPPER et al.1998; ISEROVICH et al. 2002).

As GLUTs estão presentes nas membranas de quase todas as células e representam a principal via pela qual a glicose entra nas células (STOKKEL et al. 2002).

Um aumento na taxa de transporte de glicose e no metabolismo tem sido visto em células em cultura transformadas por vírus e oncogenes. Esta transformação é associada com mudanças na expressão das proteínas carreadoras de glicose na membrana das células (FLIER et al. 1987; YOUNES et al. 1996). Essas mudanças nas proteínas (GLUTs) podem ser feitas por sinais intra e extracelulares, onde existem uma variedade de mecanismos que aceleram o uso de glicose pela célula transformada favorecendo o crescimento de tumores em células malignas (BONDY et al. 1992).

1.1.2 Função da GLUT

Atualmente são conhecidos 13 membros da família GLUT (GLUT -1 a GLUT-12 e HMIT) (STUART WOOD et al. 2003). As isoformas confirmadas são expressas de formas específicas nos tecidos e exibem distintas propriedades cinéticas e regulatórias, refletindo presumidamente seus papéis funcionais específicos. Em células com câncer é observada uma expressão de certas isoformas de GLUTs, as quais sob condições normais não são expressas (SLOT et al. 1991; BONDY et al. 1992). Dentre esses subtipos ou isoformas, GLUT-1 e GLUT-3, têm uma expressiva afinidade pela glicose e, portanto, desempenham importante papel em tecidos dependentes de glicose como fonte de energia (STOKKEL et al. 2002).

A GLUT-1 foi o primeiro membro identificado nesta família, originalmente presente em eritrócitos, mas é igualmente presente em muitos tecidos humanos. Esta isoforma da proteína é provavelmente a responsável pela entrada constitutiva de glicose nas células em uma grande variabilidade de tumores. Apesar destas múltiplas isoformas de GLUT, a GLUT-1 é o “transportador-chefe” de glicose para as células tumorais, estando presente em diversas linhagens de células tumorais (MUECKLER 1994).

A isoforma GLUT-3, referida como uma proteína transportadora de glicose neurônio-específica, foi originalmente clonada de uma biblioteca de cDNA de músculos humanos fetal, sendo encontrada numa variedade de tecidos periféricos humanos (KAYUANO 1998). Estudos posteriores encontraram uma expressão mais restrita nesses tecidos, incluindo o cérebro e o testículo (BARBER 1993). Estudos em roedores, o RNAm da GLUT-3 e a sua proteína exibiram um perfil de expressão ainda mais restrito, sendo observado somente no cérebro (MAHER et al. 1992; NAGAMATSU et al. 1992). Através da imunoistoquímica foi possível descrever com mais detalhes a expressão dessa proteína no cérebro, ilustrando a sua localização. Essa afinidade particular do GLUT-3 por hexoses, tem um efeito protetor para esses tecidos/células, contra deprivação de energia necessária para o seu metabolismo ou em episódios de hipóxia (HABER et al. 1992; CIDAD et al. 2004).

1.1.3 GLUT e Prognóstico nas Neoplasias

Embora as consequências metabólicas do aumento do transporte de glicose ainda não sejam compreendidas completamente, a expressão do transporte de glicose tem sido sugerida como de importância clínica por muitos tumores sólidos. É sabido que as células malignas necessitam de um aumento na captação de glicose. Esse aumento do consumo de glicose ajuda a manter a energia necessária para a rápida proliferação dessas células, e representa uma importante mudança adaptativa para superar as condições de adversidade existente no meio ambiente dos tumores. Por essa razão, mudanças metabólicas podem ser usadas para fornecer informações de diagnósticos e prognósticos (OLIVER et al. 2003).

A expressão de GLUT-1 foi demonstrada em pacientes com tumores de múltiplos sítios e origem histogenética, tais como: carcinoma pulmonar de pequenas células (MAROM et al. 2001), adenocarcinoma colorretal (HABER et al. 1998), carcinoma gástrico, de ovário e de CECP (OLIVER et al. 2004).

Embora a expressão de GLUT-1 seja comum em pacientes com CECP, o valor prognóstico desse parâmetro não tem sido analisado sistematicamente para este tipo de tumor. Para o melhor do nosso entendimento, somente BAER et al. (2002), consideraram a GLUT-1 como fator prognóstico significativo em CECP. Nota-se, portanto, que o valor da expressão de GLUT-1 em CECP se mantém quase inexplorado.

O aumento da RNAm de GLUT-1 e de GLUT-3 são encontrados em tumores do cólon, do pâncreas e do cérebro. Já a expressão dessas proteínas é observada em cânceres de cabeça e pescoço, pulmão, mama,

tireóide, bexiga, pâncreas e ovário (MELLANEN et al. 1994; HIGASHI et al. 1997; MAROM et al. 2001). O número de estudos da GLUT-1 em câncer de ovário é baixo. Em alguns estudos com tumores epiteliais de ovário encontraram um significativo aumento progressivo da expressão de GLUT-1 em tumores *bordeline* a tumores malignos (CANTUÁRIA et al. 2000; OZCAN et al. 2005). Ainda encontraram que a intensidade da expressão de GLUT-1 foi 100% em tumores malignos de ovário, porém, não estava associada com as características do tumor nem com a sobrevida dos pacientes (RUDLOWSKI et al. 2004; KUOKAWA et al. 2004). Recentemente, essa proteína tem sido relatada como altamente expressa no endométrio e no útero, sugerindo um importante papel durante os eventos precoces da carcinogênese (IDREES et al. 2006).

1.2 CÂNCER DE OVÁRIO

Dentre as neoplasias ginecológicas, o câncer de ovário representa ser o mais letal e é o terceiro mais freqüente no aparelho genital feminino. O câncer de ovário de acordo com dados da literatura estrangeira e da nacional, mostra ser crescente com a idade e ocorre geralmente por volta dos 50 anos (LATORRE e FRANCO 1997). Porém, independente do país, pouco se tem avançado nas últimas décadas, em termos de diagnóstico precoce e melhora da sobrevida dessa localização de câncer. Tanto a incidência quanto a mortalidade têm se mantido mais ou menos constantes na maioria dos países, desenvolvidos ou não. A raça branca mostra maior a

prevalência desse tumor. Somente cerca de 20-30% dos pacientes são diagnosticados no estágio inicial da doença, onde seria curativo com apenas tratamento cirúrgico e quimioterapia adjuvante (MARTIN e BROWN 2004). Apesar de existirem técnicas avançadas para o tratamento, a sobrevida de 5 anos é ainda menor que 30% em pacientes nessa situação. E isso se relaciona, em parte, com a falta de entendimento sobre a patogênese da doença (CANTUÁRIA et al. 2001). Uma outra questão importante quando se fala em sobrevida é o estágio do tumor, que é o fator prognóstico mais importante, seja qual for a sede anatômica do câncer. A classificação atualmente utilizada para o estadiamento de todas as neoplasias malignas do ovário é aquela estabelecida pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), no ano de 1987, sendo o fator prognóstico mais importante para os carcinomas ovarianos. As taxas de sobrevida 5 anos após o diagnóstico para pacientes com estágio I variam em torno de 55 a 90%, passando para 0 a 40% no estágio II, e de 0 a 30% nos estádios III e IV, enfatizando a necessidade de se fazer a detecção precoce (YODER 1990).

A classificação dos tumores de ovário sofreu várias modificações desde sua publicação pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1973 (LATORRE e FRANCO 1997). A atual versão, adotada pela OMS, é o resultado do conhecimento acumulado em mais de duas décadas, período em que novas neoplasias foram descritas e os tumores já conhecidos puderam ser avaliados quanto à resposta terapêutica e comportamento biológico. Nesta classificação, a grande variedade de tumores ovarianos é

simplificada pelo agrupamento dos mesmos quanto a sua histogênese e comportamento biológico, facilitando o planejamento terapêutico. O ovário possui revestimento por epitélio que representa mesotélio modificado, que repousa sobre o estroma subjacente. Este epitélio pode se insinuar no estroma e originar os chamados cistos de inclusão. Tumores originários do epitélio superficial do ovário ou do peritônio pélvico e do abdômen inferior (sistema mulleriano secundário), acompanham-se de graus variáveis de proliferação do mesênquima subjacente, denominando-se, portanto, tumores epiteliais-estromais superficiais e são classificados com base na diferenciação epitelial e potencial de malignidade.

Os padrões de diferenciação epitelial refletem o potencial mulleriano do mesotélio: seroso, mucinoso, endometrióide, de células claras e transicional. A apresentação microscópica e, nos casos de carcinoma, o comportamento biológico, dependem, em parte, do tipo de diferenciação epitelial. Quanto ao potencial de malignidade, podem ser benignos, malignos ou ainda de baixo potencial de malignidade, e estes últimos também denominados “proliferativos atípicos” ou *borderlines*.

Uma grande variedade de outros tumores pode ser encontrada no ovário, incluindo tumores mistos de células germinativas-cordões sexuais-estromais, mesoteliais, trofoblásticos, gestacionais, de partes moles não-específicos do ovário entre outros. Esse fato está relacionado com a sua complexa embriologia e as diferentes estruturas histopatológicas que o compõem. Porém, os mais estudados e encontrados descritos de forma abundante na literatura são os tumores epiteliais do ovário, que corresponde

a 80% dos tumores. (GARZETTI et al. 1997). Neste trabalho damos mais ênfase aos tumores papilíferos serosos do ovário.

Os eventos moleculares e genéticos associados com a oncogênese precoce do ovário ainda permanecem desconhecidos, e isso, fortalece a falta de confiança em biomarcadores moleculares usados para a detecção desta neoplasia, contribuindo, assim, para o diagnóstico tardio da maioria dos tumores ovarianos (CVETKOVIC 2003).

1.3 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO (CECP)

Este é o tipo mais comum de tumor maligno de cabeça e pescoço e representa cerca de 93% de todos os tumores malignos da cavidade oral. Totalizando de 3-4% de todos os carcinomas, é a 11^a causa mais freqüente de morte por câncer, com uma tendência a dominar as idades entre 50-60 anos para a população masculina (BLOT et al. 1988). A carcinogênese pode ser induzida por uma combinação de fatores, tais como: consumo de tabaco, álcool, fatores dietéticos, fatores ocupacionais, infecção viral, fator imunológico e alterações genéticas, sendo que a associação do álcool e do tabaco constitui-se como fator de risco dominante nos portadores de câncer do trato aero-digestivo superior. Há um aumento de evidências de que as infecções virais podem estar implicadas em alguns casos de CECP (NABER E WOLFE 2001).

Segundo a estimativa de incidência de Câncer no Brasil para 2006, este tipo de tumor apresentará 10.060/100000 casos novos estimados entre homens e 3.410/100000 casos novos entre as mulheres (Ministério da Saúde 2005). Os dados do Instituto Nacional do Câncer-INCA mostram uma grande diferença regional em nosso País. A taxa bruta de incidência em homens por região geográfica do país são muito diferenciadas, sendo a região Norte 3,3/100000, no Nordeste de 4,5/100000, no Centro-oeste de 7,1/100000, no Sudeste de 14,8/100000 e na região Sul de 14,1/100000 (Ministério da Saúde 2005). Tais diferenças regionais nas taxas de incidência no país sugerem a existência de fatores ambientais na etiologia desta doença.

Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, originado do epitélio escamoso é um tumor epitelial maligno com uma diferenciação escamosa caracterizada pela formação de ceratina ou pela presença de pontes intercelulares ou de ambas. Ainda o tamanho do tumor, o seu estágio e a presença de glânglios matástáticos representam os fatores prognósticos mais importantes para um paciente com CECP (NABER e WOLFE 2001).

O comportamento pode ser agressivo, apresentando metastatização cervical precoce, onde o local de envolvimento linfonodal depende da localização do tumor primário. Metástases de linfonodos cervicais, segundo alguns estudos, contribuem fortemente como uma influência negativa na sobrevida desses pacientes, diminuindo esse tempo de sobrevida pela metade, pois também se correlaciona com o aumento do risco de desenvolver metástases à distância (NABER e WOLFE 2001).

O tratamento primário para esse tipo de tumor na maioria dos casos é cirurgia, associado ou não à radioterapia adjuvante, sendo esta última a principal arma terapêutica quando o tumor é inoperável. Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas há mais de 20 anos, a sobrevida global de 5 anos desses pacientes se mantém baixa. Recorrência de linfonodo local ou regional contribui para o fracasso no tratamento.

O sistema de estadiamento clínico, TNM, apresenta muitas qualidades, principalmente por avaliar as características fundamentais de um câncer que são: extensão local, invasão do tumor (T), disseminação regional (N) e metástases à distância (M), por isso, permanece como um importante determinante do prognóstico de CECP, confirmando a sua importância em prever sobrevida global e livre de doença. Os sistemas de gradação histológica de malignidade são importantes, tendo em vista que enfatizam as características histopatológicas e a relação imunológica entre o tumor e o hospedeiro. A localização anatômica da lesão também deve ser considerada como uma indicadora de prognóstico, já que os tumores apresentam comportamentos diferentes dependendo da localização anatômica (NABER e WOLFE 2001).

Devido ao diagnóstico tardio, o prognóstico da doença é geralmente pobre e com uma estimativa de recorrência de 30% (GOERRES et al. 2003; GOSHEN et al. 2005).

Dentre os vários eventos moleculares, destaca-se a participação de proteínas ligadas à regulação do ciclo celular, a proliferação celular, a expressão de oncogenes e a repressão de genes supressores de tumor, e

mais recentemente, proteínas ligadas ao metabolismo glicolítico das células (NABER e WOLFE 2001; KUNKEL et al. 2003). Essas variáveis biológicas têm feito parte de amplos estudos na tentativa de melhor prever o comportamento desse tumor na busca de uma terapia cada vez mais adequada (OLIVER et al. 2003; SCHMIDT et al. 2004; DE SCHUTTER et al. 2005).

1.4 O MÉTODO DE PET SCAN E SUA RELAÇÃO COM AS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE GLICOSE

Um dos maiores avanços na identificação dos tumores foi o desenvolvimento de outra maneira de se detectar áreas tumorais celulares: a utilização do método de ^{18}F -FDG “Pet Scan” (tomografia de emissão de positron (Pet) com 18 –fluor, 2 deoxyglucose; FDG -investigador radioativo). O método foi introduzido há aproximadamente uma década e mais recentemente passou a ser utilizada em nosso hospital. A introdução desse método tem aberto um novo campo de métodos não-invasivos para diagnósticos precoces, avaliação da extensão da doença, planejamento e monitoramento do tratamento e detecção de doenças recorrentes (AK et al. 2000). Esse método avalia também a atividade metabólica do tumor, assim como a taxa proliferativa e a análise funcional do tumor. Hoje esse método tem sido considerado o padrão-ouro da atividade metabólica celular tumoral em medicina nuclear, podendo dar uma idéia melhor da extensão da doença de base do que os métodos usuais de imagem. Além disso, a atividade

metabólica pode oferecer informações adicionais acerca da biologia e comportamento do tumor, as quais contribuirão para o estadiamento de vários tipos de tumores (MAROM et al. 2001; KUROKAWA et al. 2004).

O método é baseado na constatação do elevado consumo metabólico de glicose nos tumores malignos, feita na década de 30 de acordo com Warburg et al. 1930, citado por GJEDDE (1995, p.58). Posteriormente, se demonstrou estar associado ao aumento do número das moléculas transportadoras de glicose na superfície das células tumorais, aos níveis elevados de hexoquinase e aos níveis reduzidos de glicose 6-fosfatase em células tumorais (FLIER et al. 1987).

O nível de captação de glicose *in vivo* pode ser um marcador prognóstico em pacientes com carcinoma de pulmão, de mama e de CECP (BUCK et al. 2004).

A aplicação prática desta descoberta para a geração de imagens em medicina nuclear foi iniciada após a síntese da ^{18}F -Fluorodeoxiglicose (^{18}F -FDG) (IDO et al. 1979). O ^{18}F -FDG é um análogo da glicose que quando fosforilado permanece no interior das células neoplásicas, em razão diretamente proporcional à atividade metabólica celular, permitindo a localização topográfica e as quantificações absoluta e relativa da atividade glicolítica tecidual (GJEDDE 1995).

A expressão de GLUT-1 na maioria dos tumores associa-se com a captação da ^{18}F -FDG nas células tumorais, como em câncer pancreático (ITO et al. 1998; BROWN et al. 1999; HIGASHI et al. 2000; MAROM et al. 2001; OLIVER et al. 2004), embora haja alguns autores que tenham uma

visão um pouco diferente (MAROM et al. 2001). Durante o estadiamento clínico, falso-positivos estão relacionados com hiperplasias linfonodais ou processos inflamatórios. Os resultados falso-negativos estão relacionados com tumores com baixa expressão de GLUT-1, tais como os adenocarcinomas (MOCHIZUKI et al. 2001; KALIR et al. 2005).

Por outro lado, pouco se sabe sobre a relação da efetividade do Pet Scan e outras isoformas de GLUT. Estudos de pacientes com neoplasia pulmonar maligna, não encontraram associação estatística entre as expressões GLUT-1 e GLUT-3 com a captação de FDG no exame de Pet Scan (MAROM et al. 2001; TIAN et al. 2004). A expressão de GLUT-3, em alguns trabalhos, ocorreu somente quando GLUT-1 foi expresso, e sempre a expressão de GLUT-3 era mais fraca que a proteína eritrocítica. A proteína GLUT-3, portanto, pode ser um evento tardio no processo de progressão neoplásica (MAROM et al. 2001).

Mais estudos são necessários para associar o aumento da captação da FDG por tumores com suas expressões de GLUTs. Embora se tenha observado que os subtipos da família de transportadores de glicose (GLUTs) sejam responsáveis pelo aumento do transporte de glicose e de FDG necessário para preencher o metabolismo anormal requerido por células tumorais (TIAN et al. 2004), até o momento, poucos estudos têm associado a atividade de FDG e transportadores de glicose em cânceres humanos.

Pela revisão da literatura aqui apresentada, a relação entre a captação de FDG e a expressão das GLUTs, em vários tumores humanos ainda está sob debate, havendo a necessidade de entender por que alguns

tumores não parecem serem ávidos por FDG e entender o significado clínico de alta intensidade da captação. Ainda, ao melhor de nosso conhecimento, há poucos estudos na literatura relacionando a expressão de GLUT-1, GLUT-3, e os achados de Pet-Scan, como também a associação dessas proteínas com tumores de ovário e cabeça e pescoço. Em nosso meio, há poucos trabalhos utilizando casos de pacientes brasileiros para testar o efeito dessas moléculas como marcadores prognósticos nessas neoplasias.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho será estudar, por imunoistoquímica, a expressão das proteínas da família GLUTs (GLUT-1 e GLUT-3) e suas interações:

- a. Estudar a expressão imunoistoquímica de GLUT-1 e GLUT-3 e comparar com os casos em que foram realizados os exames de Pet Scan/CT, relacionar os seus achados com a efetividade desse exame de imagem em pacientes portadores de CECP e tumores metastáticos de ovário.
- b. Associar os dados referentes à expressão de GLUT-1 e GLUT-3 com as características clínico-patológicas e sobrevida dos pacientes portadores de CECP da cavidade oral.

CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PACIENTES E AMOSTRAS

Dois grupos distintos de pacientes foram analisados neste estudo. O primeiro deles, pacientes selecionados a partir do Departamento de Imagem, Setor de Medicina Nuclear, Hospital A C Camargo e descritos em detalhe no item 3.1.1. O segundo grupo foi selecionado a partir de série retrospectiva de pacientes portadores de CECP da boca, oriundos do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do mesmo hospital e descritos no item 3.1.2.

3.1.1 Pacientes submetidos ao exame de Pet Scan

Foi realizada a seleção de pacientes que foram submetidos ao Pet Scan com ^{18}F -FDG, a partir de exames consecutivos realizados pelo Departamento de Imagem, setor de Medicina Nuclear, de 2001-2006. Estes exames foram realizados com o objetivo de investigar uma possível recidiva da neoplasia. Foram selecionados para este estudo casos de carcinoma de ovário e de CECP, descritos em detalhe no item A seguinte. Os prontuários médicos selecionados foram revistos para obtenção das informações clínico-patológicas (dados demográficos, estadiamento clínico, data e diagnóstico anátomo-patológico), resultados, objetivos e data do exame de Pet Scan. Além destes dados, foram anotados os seguimentos clínicos dos pacientes que teve início a partir da data de cirurgia até a data do óbito ou da última

consulta na época da última análise dos prontuários. Foram selecionados 24 casos de tumores epiteliais de ovário recidivados e 30 casos de CECP, para investigar uma possível recorrência tumoral. Esses pacientes foram selecionados seguindo os critérios de inclusão no estudo:

- pacientes que foram submetidos ao Pet Scan;
- disponibilidade de dados clínicos, cirúrgicos e do exame anátomo-patológico;
- prontuário médico com dados completos obtidos através do Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME);
- disponibilidade de lâminas e blocos de parafina para revisão e estudo imunoistoquímico.

Todas as respectivas lâminas e blocos de parafina dos casos em questão foram recuperados do arquivo para a obtenção de novos cortes e coloração em HE, que foram revistas por um patologista do Departamento de Anatomia Patológica. A revisão da lâmina permitiu reavaliar o diagnóstico e o tipo histológico da neoplasia. Foram então selecionadas áreas representativas de malignidade para a análise imunoistoquímica, como se vê na Figuras 1 e 2.

A Características dos pacientes incluídos no estudo

A casuística é composta por 30 casos de CECP, sendo 25 homens e 5 mulheres, com idade variando entre 16 a 82 anos (mediana de 58 anos). Apenas 1 paciente era da cor preta. Destes, 12 (40%) eram tumores primários da boca, oito (26,7%) da laringe, sete (23,3%) da faringe e três (10%) da rinofaringe. Alguns dos casos estudados encontravam-se em estágio avançado da doença (11 casos) no momento do diagnóstico. As características clínicas dos pacientes com tumores primários da cabeça e pescoço estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características demográficas dos 30 casos de CECP analisados nesse estudo.

Variável	Categoria	Número de casos (%)
Gênero	Masculino	25(92,3)
	Feminino	5(7,7)
Cor	Branco	29(96,6)
	Não-branco	1(3,4)
Topografia	Cavidade Bucal	12(40,0)
	Laringe	8(26,7)
	Faringe	7(23,3)
	Rinofaringe	3(10,0)
Estadio	Inicial (I, II)	7(23,4)
	Avançado (III,IV)	11(36,6)
	Não estadiado	12 (40,0)
Evolução da Doença	Vivos sem Doença	15 (50,0)
	Vivo com Doença	5 (16,7)
	Morto devido à Doença	10 (33,3)
Total		30(100)

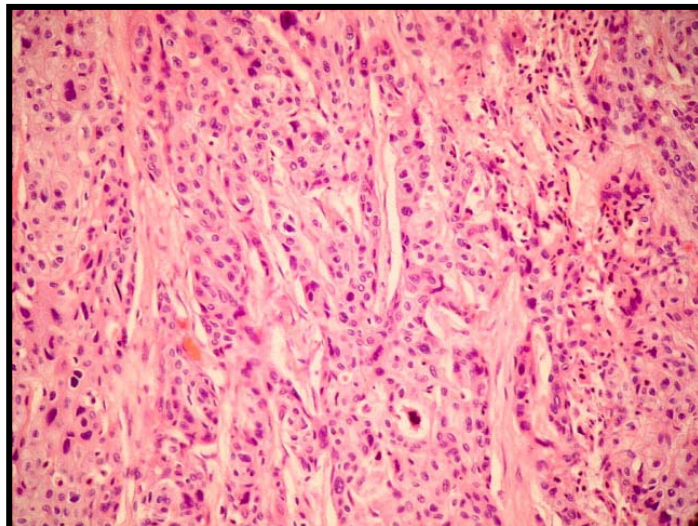
No presente estudo foram também incluídos 24 casos de tumores recidivados de ovário, com idade de 32 a 79 anos com média de idade de 58,4 anos (mediana de 60 anos), sendo a maioria indivíduos de cor branca (95,8%).

Quando possível os casos foram classificados de acordo com o estadiamento, baseados nos achados da primeira cirurgia de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO); 16,7 % foram considerados em estadio precoce (0, I e II) e 37,5 % em estágio avançado (III e IV). Alguns casos não puderam ser avaliados segundo esse critério (45,8%).

Histologicamente, a maioria dos diagnósticos era de adenocarcinoma seroso papilífero (n=21; 87,5%), seguido de adenocarcinoma de células claras (n=2; 8,3 %) e um caso de leiomioma uterino (Pet Scan - falso - positivo).

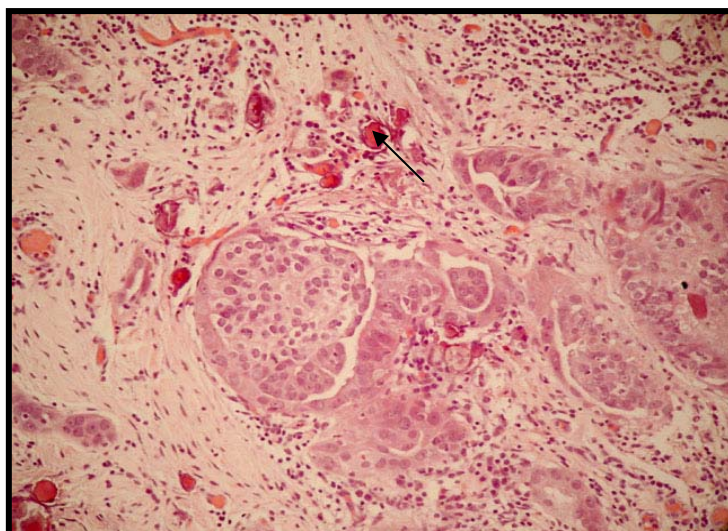
No presente estudo, 21 pacientes com adenocarcinoma seroso papilífero metastático mostraram progressão ou recorrência (7 desses morreram da doença), sendo 1 caso com recorrência no ovário. Enquanto que 4 desses pacientes com esse tipo histológico foram encontrados vivos sem evidência de doença, após tratamento e dez pacientes vivos com doença até a data da última notícia. Observamos 2 pacientes com adenocarcinoma metastático de células claras que apresentaram progressão da doença e.

Os 24 pacientes foram classificados de acordo com a evolução da doença, em vivo sem doença (16,6%), vivo com doença (54,2%), morte com câncer (29,2%).



Legenda: Crescimento coesivo, ausência de ceratina. Nota-se somente uma diferenciação em pontos. Coloração com hematoxilina-eosina (H.E.100X).

Figura 1 - Fotomicrografia mostrando carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.



Legenda: Corpos psamomatosos (seta). Coloração com hematoxilina-eosina (H.E.200X).

Figura 2 - Fotomicrografia mostrando adenocarcinoma seroso de ovário.

3.1.2 Pacientes com CECP de boca

O segundo grupo de pacientes analisados foi de pacientes portadores de CECP da cavidade oral operados pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Essa seleção foi feita a partir do Banco de Dados do Departamento de Anatomia Patológica, sendo incluídos casos operados de 1990-2001.

Foram recuperadas todas as lâminas e blocos de parafina originais e blocos representativos da neoplasia foram selecionados para a confecção de um bloco de arranjo tecidual em matriz (TMA, do inglês *tissue microarray*). Os prontuários médicos selecionados foram revistos para obtenção das informações clínico-patológicas, dados demográficos, história clínica, local primário do tumor, estadiamento clínico, anátomo-patológico da peça de cirurgia inicial, tratamento realizado, evolução da doença e *status* do paciente até o último contato com este serviço. Para a confecção do bloco de TMA foram selecionados 151 casos.

O estadiamento clínico dos tumores foi categorizado de acordo com o sistema TNM da União Internacional contra o Câncer em T, N e M (NABER e WOLFE 2001).

A revisão desses prontuários médicos e dos registros hospitalares foi feita através do preenchimento de um formulário pré-estabelecido (Anexo 1).

3.2 CONSTRUÇÃO DO ARRANJO TECIDUAL EM MATRIZ (TISSUE MICROARRAY -TMA)

Para o estudo, foi construído um bloco de TMA, contendo 302 cilindros de 1mm, sendo o primeiro cilindro representado por um fragmento de fígado normal, utilizado como referência.

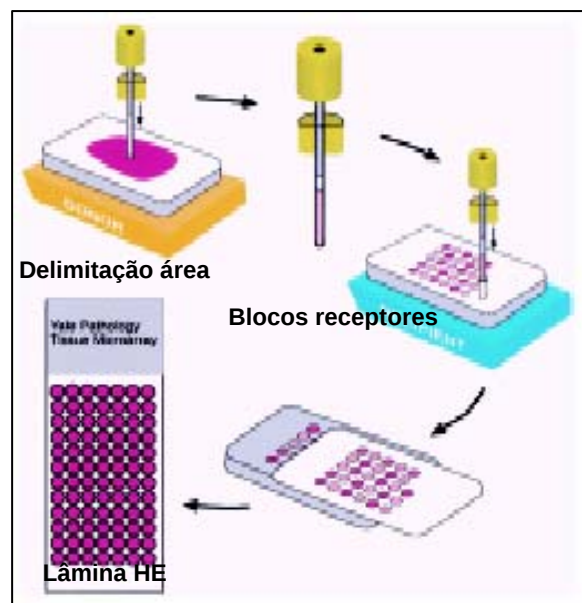
No bloco foram incluídas cerca de 151 amostras de casos distintos de CECP de boca, foram dispostas em ordem numérica crescente (de acordo com o registro anátomo-patológico), independente do grau de diferenciação e comportamento biológico, e colocados em duplicata, correspondendo a áreas diferentes da mesma amostra (exame anatomo-patológico). Novas lâminas coradas por HE foram obtidas. Para a construção do bloco de TMA, estas foram analisadas para delimitação da área mais representativa do tumor. Em seqüência, cilindros de 1mm de diâmetro contendo amostras de tumor foram retirados dessas áreas pré-delimitadas dos blocos de parafina dos casos a serem estudados (blocos doadores) e foram transferidas para um bloco receptor, em uma posição cuja coordenada foi previamente definida. Com o bloco de TMA pronto, foram obtidos cortes de 6µm de espessura, colhidos em lâminas com adesivos adquiridas junto a Microsystems Inc[®]. O TMA foi construído com a máquina (*Tissue Microarrayer*) fabricada pela Beecher Instruments[®] (Silver Spring MD) e em uso no Departamento de Anatomia Patológica. O processo está sumarizado na Figura 3.

Finalmente, as lâminas de TMA prontas, foram desparafinizadas, desidratadas e submetidas à análise imunoistoquímica.

Após a reclassificação histológica, 9 casos foram excluídos da análise por se tratar de alguma das possibilidades descritas abaixo. Portanto, a resultante foi a casuística final de 142 casos cirúrgicos de CECP da cavidade oral com áreas representativas de tumor para a análise imunoistoquímica.

Dos casos listados para o estudo, alguns pacientes não puderam ser analisados e foram excluídos do estudo, devido à:

- indisponibilidade de lâminas e blocos de parafina para revisão e estudo imunoistoquímico ;
- não confirmação do diagnóstico de CECP;
- ausência de tumor nos blocos residuais;
- material escasso por biópsias incisionais.



Fonte: Modificado de RIMM et al. (2001).

Figura 3 - Construção do *Tissue Microarray*

3.3. MÉTODO E ANÁLISE DAS REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunoistoquímica foram realizadas pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, DAKO®). Os passos técnicos realizados foram os já tradicionalmente descritos na literatura e que podem ser vistos no Anexo 2.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum e os resultados foram classificados semi-quantitativamente.

Para o estudo da relação entre a expressão de GLUTs e o Pet-Scan, a reação imunoistoquímica foi feita em cortes convencionais, ou seja, 1 corte representativo do tumor por lâmina.

Nas lâminas de TMA de CECP oral, foram realizadas reações imunoistoquímicas em duplicata com a seleção de duas lâminas com pelo menos 40 cortes de distância entre elas. Considerando que cada caso está disposto em duplicata no bloco receptor de TMA, foram feitas 4 análises de imunoistoquímica por caso. As análises do TMA das proteínas foram feitas baseadas no local de marcação das células (membrana ou núcleo, membrana e núcleo) e na quantidade de células positivas. Agrupou-se algumas características do marcador GLUT-1, em que a localização da imunorreatividade foi reunida em MN/N e ainda estratificada quando analisada com o número de células marcadas, em MT-membrana total; MP-membrana parcial; MNP- membrana/núcleo parcial e MNT-membrana/núcleo total. Para a análise do marcador GLUT-3 utilizamos somente a expressão de acordo com a presença ou ausência de marcação na membrana das células, desprezando o número de células marcadas.

Essa frequência de células marcadas, classificada em parcial ou total, foi baseada no nível de corte de 85% de células positivas para o biomarcador. Estes critérios estão discriminados no Quadro 1 e 2.

Todas as reações foram realizadas com controle positivo (tecido sabidamente expresso do antígeno) e dois controles negativos (retirada do anticorpo primário ou retirada do anticorpo secundário). Forte marcação na membrana de eritrócitos foi observada e utilizada como um controle positivo interno de GLUT1 e células inflamatórias para GLUT3.

Quadro 1 – Critérios para graduação da expressão de GLUT-1, baseados na frequência de células coradas e intensidade de marcação (TMA).

Categoria	Escore	Característica
Frequência	P	Parcial, menos do que 85% das células marcadas
	T	Total, mais do que 85% das células marcadas
Local da Marcação	M	Membrana
	N	Núcleo
	M/N	Membrana e Núcleo
	Negativo	Ausência de marcação

Quadro 2 – Critérios para graduação da expressão de GLUT-3, baseados na frequência de células coradas e intensidade de marcação (TMA).

Categoria	Escore	Característica
Frequência	P	Parcial, menos do que 85% das células marcadas
	T	Total, mais do que 85% das células marcadas
Local da Marcação	Positivo	Membrana
	Negativo	Ausência de marcação

Nos casos de cortes convencionais, a análise foi baseada num sistema de escore definido pelo produto da intensidade da reação e número de células positivas, onde foi feita somente uma análise por caso (CANTUÁRIA et al. 2001). Esta graduação pode ser vista conforme no Quadro 3. A partir da observação dos cortes, estabeleceu-se o escore total (TS) que corresponde à multiplicação dos escores de frequência e intensidade e pode variar de 0 a 12. O escore de frequência de células coradas (PS, *proportion score*) é o escore que varia de 0 a 4 de acordo com a proporção de células coradas (0) <1%, 1) 1-10%, 2) 10-50%, 3) 50- 90%),

4)>90%) e o escore de intensidade (*IS, intensity score*) é o escore que avalia a intensidade da coloração e que varia de 0 a 3 de acordo com a intensidade da coloração das células marcadas (0) negativo, 1) fraco, 2) moderada, 3) forte).

Para a análise final, consideraram-se casos negativos aquele cujo *TS* esteve entre 0-1,9; positivos fracos quando o *TS* foi entre 2-4,9; moderadamente positivos quando o *TS* variou entre 5-8,9, e fortemente positivos os casos que o *TS* foi maior do que 9 (ALLRED et al. 2003). Este critério está resumido no Quadro 4. As análises foram feitas com o consenso de dois observadores (autor e patologista) sem o conhecimento prévio dos dados clínicos de cada caso.

$$TS (TOTAL) = PS (proporção) \times IS (intensidade)$$

Quadro 3 – Cortes convencionais - Critérios para graduação da expressão de GLUTs (GLUT-1 e GLUT-3), baseados na frequência de células coradas e intensidade de marcação.

Categoria	Escore	Característica
Frequência	0	<1% de células positivas
	1	1-10% de células positivas
	2	10 – 50% de células positivas
	3	50 – 90% de células positivas
	4	>90% de células positivas
Intensidade da Marcação	0	Negativo
	1	Marcação fraca
	2	Marcação moderada
	3	Marcação forte

Quadro 4 - Cortes convencionais - Critério para classificação final dos casos, de acordo com a expressão de GLUTs.

Classificação	Critério
Negativo	0-1,9
Positivo Fraco	2,0-4,9
Positivo Médio	5,0-8,9
Positivo Forte	9,0-12,0

3.4 PET-SCAN/CT

O equipamento de aquisição de imagens utilizado foi o millenium VG Hawkeye ® (General Eletric – USA) que é um PET/CT do tipo não dedicado e a média de doses de ^{18}F -FDG administrada aos pacientes de 10,0 *miliCuries* (mCi). A indicação do PET/CT em todos os 24 casos de tumores ovarianos e os 30 casos de CECP foi feita para exclusão de uma possível recorrência tumoral. Os resultados foram considerados negativos ou positivos para tumores nos sítios de localização local, regional ou à distância. Foram considerados como métodos de referência-padrão os resultados de exames anatomo-patológicos (biópsia ou cirurgia), ou o seguimento clínico sem a confirmação de doença recorrente depois de 12 meses (todos os pacientes restantes). Os resultados do primeiro grupo desse trabalho foram analisados de acordo com os achados do PET/CT e comparados com os resultados da imunoexpressão dos anticorpos (GLUT-1 e GLUT-3).

3.4.1 Protocolo PET-CT não dedicado

Estudos de corpo total foram obtidos uma hora após a administração endovenosa de 10 mCi (370 MBq) / 70 Kg de ^{18}F -Fluorodeoxiglicose (IPEN–CNEN–São Paulo). A administração das doses foi precedida de repouso do paciente por 30 minutos e jejum de 12 horas em todos os casos.

As imagens de corpo total foram adquiridas em equipamento não dedicado millenium VG Hawkeye (GE medical systems) composto de um sistema de geração de imagens de raios X de 140 kVp a 2.5 mA fixado ao *gantry* de rotação contínua (*Slip ring*) com 384 detectores de estado sólido de 1,8 x 28 mm localizados na posição oposta para a obtenção das imagens anatômicas e dois bancos de detectores com circuitos eletrônicos de coincidência e cristais de cintilação de NaI (Iodeto de Sódio) de 5/8 de polegada (15,9mm) de espessura ativados com Tálcio para a obtenção das imagens metabólicas dos fótons de 511 KeV do ^{18}F -FDG.

O protocolo de imagens foi iniciado pelos cortes tomográficos anatômicos (2,6 rotações/minuto) com intervalos de 10mm e imediatamente após seguidos das imagens metabólicas do ^{18}F -FDG por aquisição continuada em *list mode* de emissão de pósitrons em coincidência por 30 minutos (1 giro / 3 min) para os segmentos abdominais e torácicos.

Ao término do procedimento os dados de imagem obtidos foram processados em *workstation* (Entegra, GE Medical Systems) onde foram reconstruídos usando um algoritmo iterativo (COSEM) capaz de reordenar os dados de coincidência com parâmetros de tempo e associar correções de atenuação obtidas com os mapas de raios X co-registrados.

Após o processamento de ambos os grupos (imagens tomográficas de raios X e imagens de coincidência de ^{18}F -FDG) as imagens foram fundidas e reconstruídas em planos transaxiais, coronais e sagitais e assim interpretadas pelo observador na tela do computador.

Todos os dados de aquisição de imagens foram arquivados em discos ópticos para possível reprocessamento e reanálise.

A análise visual das imagens utilizou como critério de positividade, a presença de concentração anormal de ^{18}F -FDG na mesma topografia do nódulo ou massa estudado, e como critério de negatividade, a ausência de concentração; concentrações em grau discreto foram consideradas como positivas.

As informações obtidas sobre os dados de evolução e resultados dos pacientes submetidos ao Pet Scan foram registradas em questionários individuais específicos sendo tabulados e analisados descritivamente, disponíveis no Departamento de Medicina Nuclear do hospital.

Os resultados finais do estudo foram correlacionados com as biópsias e a evolução clínica dos pacientes, classificados como verdadeiro - positivos e verdadeiro - negativos, falso - positivos e falso - negativos.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos da expressão imunoistoquímica de GLUT-1 e GLUT-3 e o resultado do Pet Scan estão apresentados em tabelas de distribuição.

Para os dados obtidos dos casos de TMA, foram organizados em tabelas e a análise estatística foi realizada utilizando-se o programa de computador SPSS Software, versão 12 (SPSS Inc. USA 2003). Para a análise de associação entre a expressão dos marcadores e as variáveis demográficas e clínico-patológicas, verificou-se o teste de χ^2 ou o teste exato de Fisher.

Para a análise de sobrevida global, considerou-se o tempo de seguimento como o período entre a data da cirurgia e a data de óbito e/ou última consulta.

O cálculo da estimativa da sobrevida global foi realizado pela técnica de Kaplan-Meier e as comparações entre as curvas de sobrevida, em relação as variáveis estudadas, pelo teste de Long-rank. A análise de sobrevida foi truncada em 10 anos.

A análise multivariada foi feita pelo modelo de regressão de Cox, utilizando-se o nível de significância de 10% na técnica *stepwise (forward)*.

Para todos os testes estatísticos, foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

4.1.1 Pacientes submetidos ao Pet Scan

A Expressão Imunoistoquímica: CEC

O resultado geral da análise dos marcadores está sumarizado na Tabela 2.

Dos 30 casos selecionados, 12 (40%) eram tumores primários da boca, oito (26,7%) da laringe, sete (23,3%) da faringe e três (10%) da rinofaringe, seis casos não demonstraram tumor recidivado quando realizada a biópsia. Destes seis casos, cinco eram Pet-Scan positivos (Tabela 4). Estes foram excluídos (n=6) do estudo por ser impossível a análise da expressão de GLUT-1 e GLUT-3 nas células tumorais. Os outros 24 casos foram os que restaram para serem analisados nessa casuística (Tabela 2).

Dos casos estudados, 22/24 (91,7%) CEC foram positivos para GLUT-1 com padrão de marcação de membrana. A marcação foi considerada fracamente positiva em 10/22 casos (45,5%), moderadamente positivo em 10/22 (45,5%) e fortemente positivo em dois casos (2/22) (9%). Dois casos não houve expressão de GLUT-1. Exemplos dessa marcação podem ser vistos na Figura 4.

Quando analisada a expressão da proteína GLUT-1 na mucosa normal adjacente, observamos que a expressão de GLUT-1 estava confinada na camada basal e suprabasal dessas células, apresentando uma intensidade fraca.

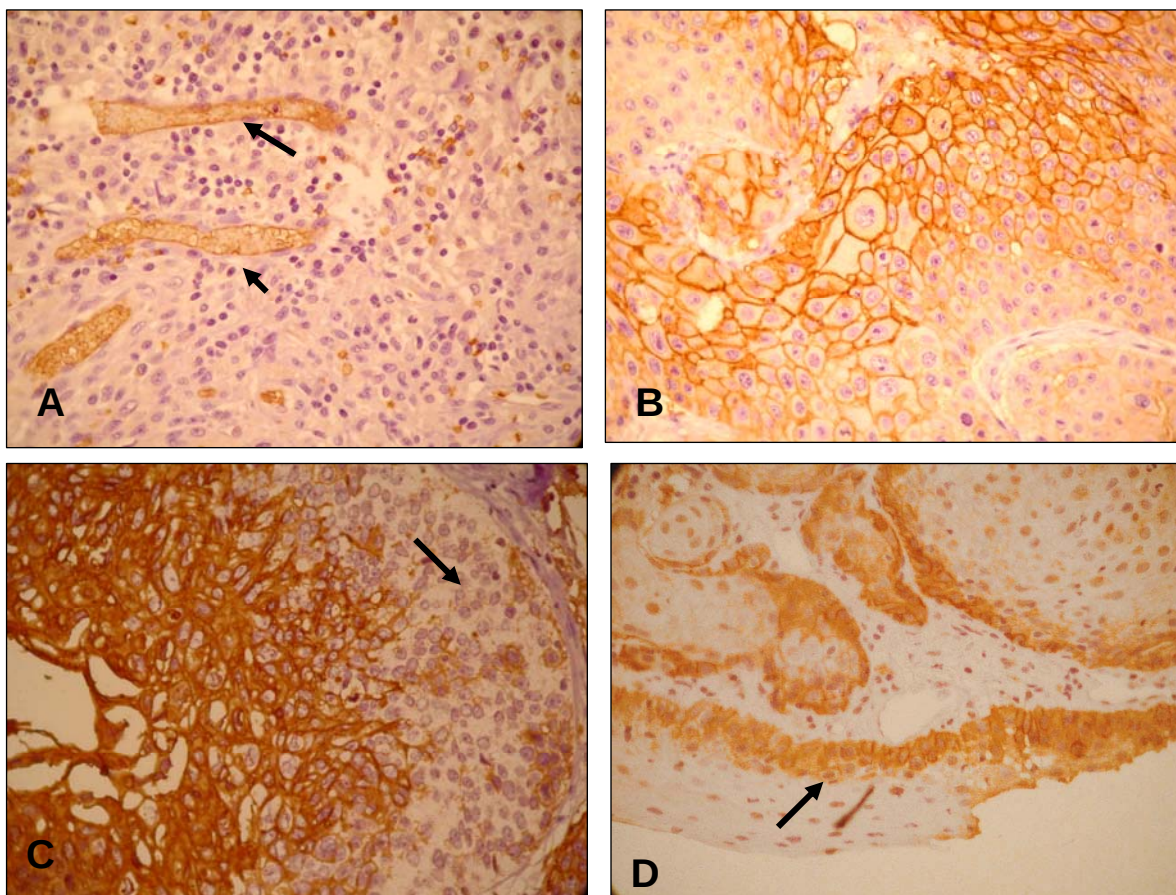
Em relação à proteína GLUT-3, foram considerados positivos os casos com marcação na membrana das células. Desses, somente 4/24 casos foram positivos (16,7%), sendo dois casos (2/4) fracamente positivos (50%) e em dois casos (2/4) moderadamente positivos (50%), não houve casos fortemente positivos. A maioria dos casos foram negativos, correspondendo a 83,4% (n=20/24). Seis casos não puderam ser avaliados pelas razões já explicadas anteriormente.

Foi encontrada marcação positiva dessa proteína em linfócitos e macrófagos do infiltrado inflamatório que serviram de controle positivo (Figura 5). Não foi observada expressão de GLUT-3 em células epiteliais normais, mas encontramos células epiteliais tanto positivas quanto negativas com a marcação da proteína GLUT-1. A expressão de GLUT-3 foi notadamente positiva apenas em casos onde a proteína GLUT-1 também apresentou marcação positiva.

Tabela 2 - Resultado geral dos marcadores em 24 casos de CECP avaliáveis.

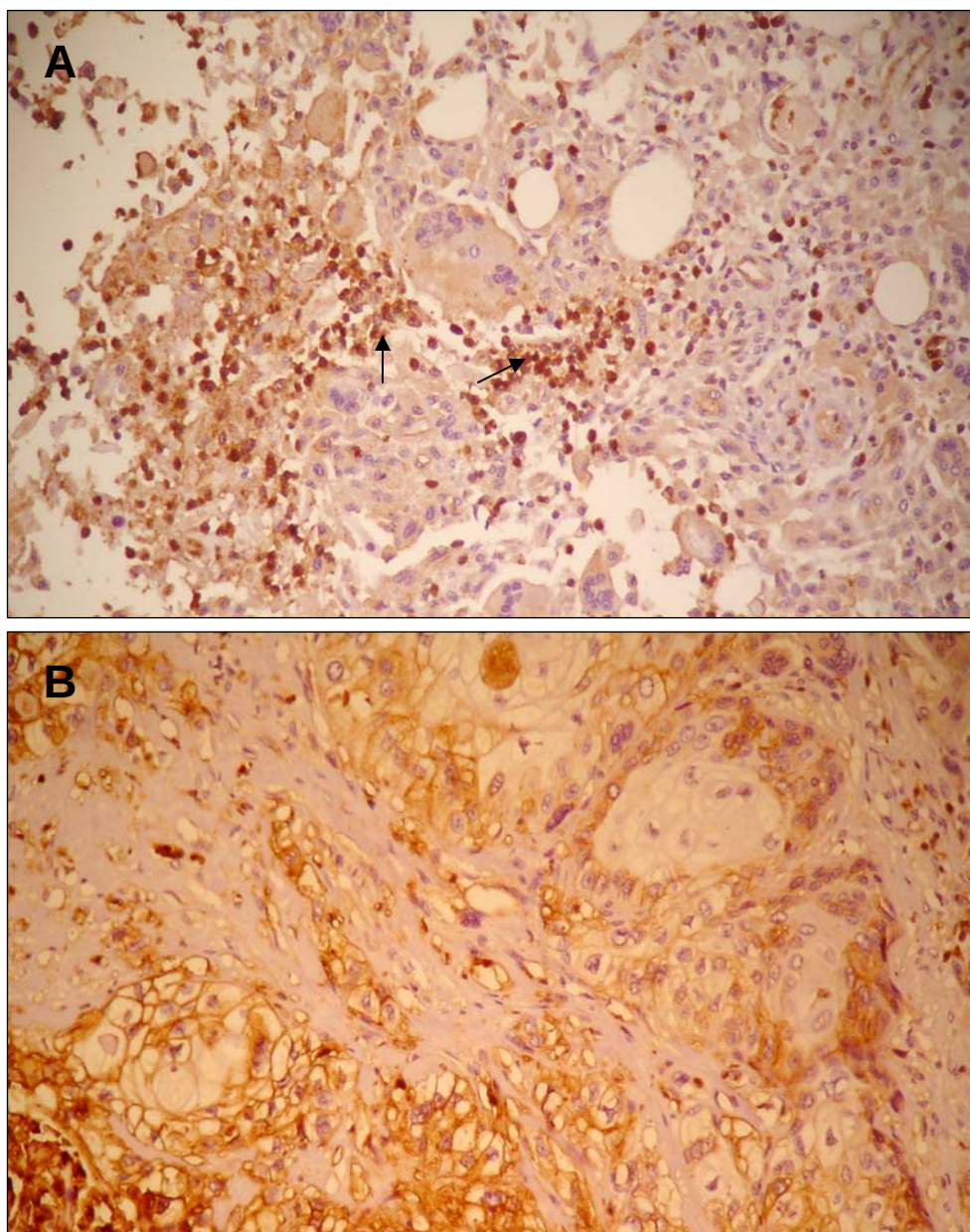
Expressão Protéica	Resultado	No.	%
GLUT-1	Negativo	2	8,3
	Positivo (fraco)	10	41,7
	Positivo (médio)	10	41,7
	Positivo (forte)	2	8,3
GLUT-3	Negativo	20	83,4
	Positivo (fraco)	2	8,3
	Positivo (médio)	2	8,3
	Positivo (forte)	0	0
Total		24	100,0

*Foram excluídos da análise seis casos que não apresentavam tumor na amostra, confirmados por biópsia.



Legenda - (A) caso negativo demonstrando controle interno positivo em eritrócitos (setas), 200x; (B) caso positivo 2+, 200x; (C) caso positivo 3+ e áreas tumorais adjacentes sem expressão de GLUT-1(seta), 400x; (D) caso positivo 2+, com expressão positiva nas células basais do epitélio normal (seta), 200x.

Figura 4 - GLUT-1: Imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de CECP.



Legenda - (A) caso negativo. Células inflamatórias apresentando positividade para essa proteína (setas), 200x. (B) marcação positiva 2+, 200x.

Figura 5 - GLUT-3: Imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de CECP.

B Expressão de GLUT-1 e GLUT-3 e os achados do Pet Scan:

A análise da distribuição entre a expressão de GLUT-1 e GLUT-3 e os achados do Pet Scan está disposta nas Tabelas 3, 4 e 5.

Dos 30 casos aqui estudados, a biópsia confirmou a presença de neoplasia em 24 casos, sendo esses os casos selecionados para a comparação. Destes, 21/24 deles apresentavam Pet Scan com evidências de tumor e apenas três casos de Pet Scan negativos. Dos casos de Pet Scan positivos (n=21), 19 eram GLUT-1 positivos e apenas dois eram GLUT-1 negativos. Em relação ao GLUT-3 houve correspondência da positividade do marcador em três casos e em 18 as células neoplásicas não expressavam GLUT-3. Dentre os três casos de Pet Scan negativos, um deles era GLUT-3 positivo e dois, GLUT-3 negativo.

Tabela 3 - Distribuição da expressão de **GLUT-1/GLUT-3** de acordo com os achados do Pet Scan nos casos de CECp em pacientes com recidiva.

Pacientes	idade	Pet	GLUT-1	GLUT-3	Recorrência	Histologia
1	58	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	CECP
2	82	Positivo	Médio	Negativo	Sim	CECP
3	75	Positivo	Médio	Negativo	Sim	CECP
4	50	Positivo	Médio	Negativo	Sim	CECP
5	72	Positivo	Médio	Negativo	Sim	CECP
6	50	Positivo	Médio	Médio	Sim	CECP
7	42	Positivo	Forte	Negativo	Sim	CECP
8	60	Positivo	Médio	Negativo	Sim	CECP
9	62	Positivo	Fraco	Fraco	Sim	CECP
10	57	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	CECP
11	81	Positivo	Negativo	Negativo	Sim	CECP
12	73	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	CECP
13	28	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	CECP
14	63	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	CECP
15	57	Positivo	Médio	Médio	Sim	CECP
16	56	Positivo	Médio	Negativo	Sim	CECP
17	76	Positivo	Forte	Negativo	Sim	CECP
18	40	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	CECP
19	62	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	CECP
20	16	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	CECP
21	73	Positivo	Negativo	Negativo	Sim	CECP
22	49	Negativo	Médio	Negativo	Sim	CECP
23	44	Negativo	Médio	Fraco	Sim	CECP
24	69	Negativo	Fraco	Negativo	Sim	CECP

Tabela 4 - Distribuição da expressão de **GLUT-1/GLUT-3** de acordo com os achados do Pet Scan nos casos de CECP em pacientes sem doença.

Pacientes	idade	Pet	GLUT-1	GLUT-3	Recorrência	Histologia
1	58	Negativo	N/A	N/A	Não	Inflamação
2	66	Positivo	N/A	N/A	Não	Inflamação
3	58	Positivo	N/A	N/A	Não	Inflamação
4	44	Positivo	N/A	N/A	Não	Inflamação
5	66	Positivo	N/A	N/A	Não	Inflamação
6	57	Positivo	N/A	N/A	Não	Inflamação

N/A: Não Avaliáveis

Tabela 5 - Distribuição da expressão de **GLUT-1/GLUT-3** de acordo com os achados do Pet Scan nos casos de CECP com recidiva.

	GLUT-1 Pos	GLUT-1 Neg	GLUT 3 Pos	GLUT-3 Neg
Pet Positivo (n=21)	19	2	3	18
Pet Negativo (n=3)	3	0	1	2

Pos: positivo
Neg: negativo

C Expressão Imunoistoquímica: Casos de Ovário

O resultado geral da análise imunoistoquímica dos marcadores está sumarizado na Tabela 6. Da mesma forma dos CECP, foi excluído um caso com Pet Scan positivo, mas a exploração posterior afastou a recidiva tumoral (biópsia).

Dos casos estudados, a expressão de GLUT-1 foi observada em 20/23 casos (87%) com padrão de marcação de membrana. Foram encontradas expressões fracamente positivas em 15/20 casos (75%), em três casos (3/20) moderadamente positivos (15%) e em dois casos (2/20) fortemente positivos (10%) (Figura 6). Três casos (3/23) foram GLUT-1 negativos (13%).

Não houve expressão de GLUT-1 em células epiteliais normais e em células do estroma ovariano. Algumas células do tumor apresentaram positividade para GLUT-1 em regiões perinecroticas.

Foi observada uma marcação positiva para GLUT-1 na superfície das papilas de carcinomas papilíferos serosos em casos bem diferenciados, já em tumores poucos diferenciados a expressão dessa proteína estava presente mais ao centro do tumor (Figura 7).

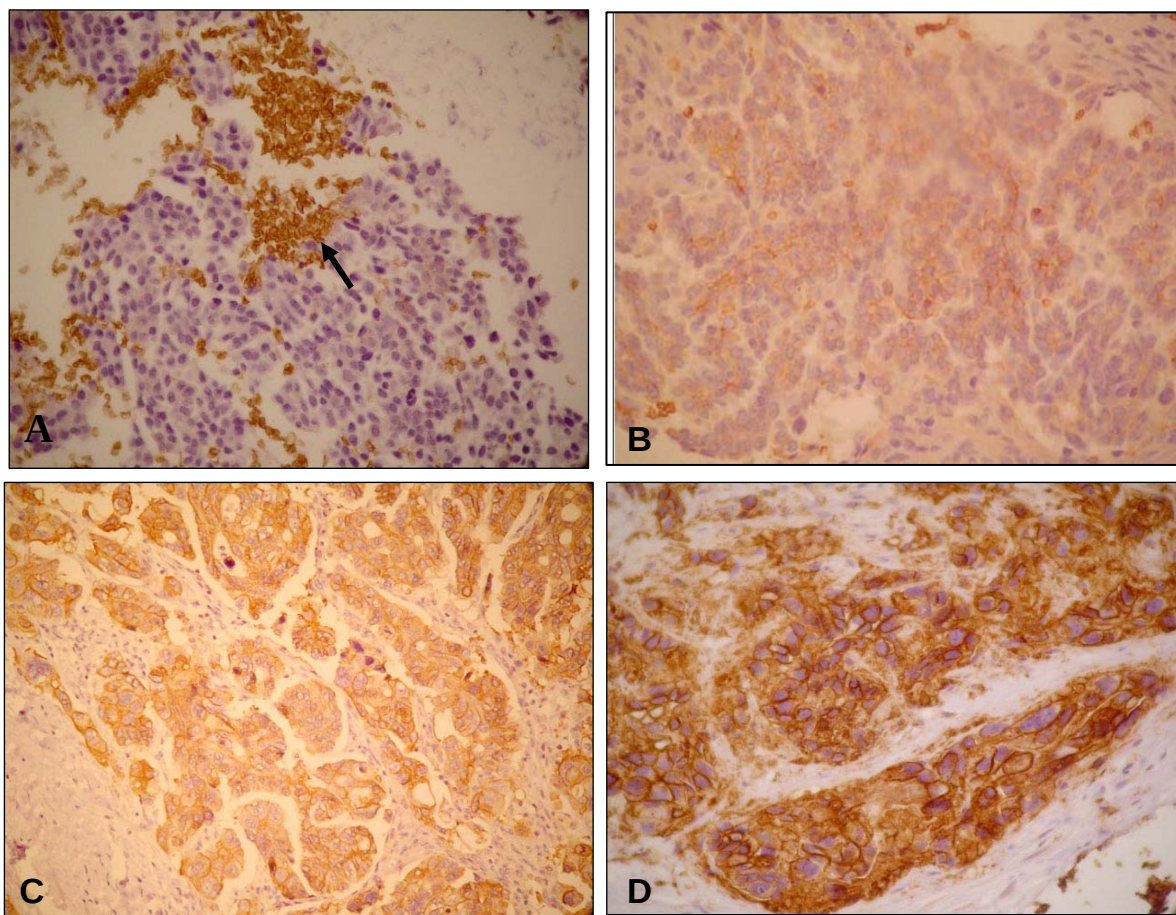
Em relação à proteína GLUT-3, foram considerados positivos os casos com marcação na membrana. Somente 5/23 casos foram positivos (21,7%). Desses, dois casos (2/5) fracamente positivos (40%) e em um caso (1/5) fortemente positivo (20%). Dois casos (2/5) foram observados com expressão nuclear (40%) inesperada de GLUT-3 em tumores metastáticos de ovário que não havia expressão para GLUT-1. A maioria dos casos foram negativos para GLUT-3, 78,3% (n=18/23) (Figura 8). Um caso não pode ser avaliado, por razões descritas anteriormente.

A proteína GLUT-3 foi expressa quando havia imunoexpressão da proteína GLUT-1 no tumor. Também foi encontrada marcação positiva de GLUT-3 em linfócitos e macrófagos do infiltrado inflamatório.

Tabela 6 - Resultado geral dos marcadores em 23 casos metastáticos de ovário.

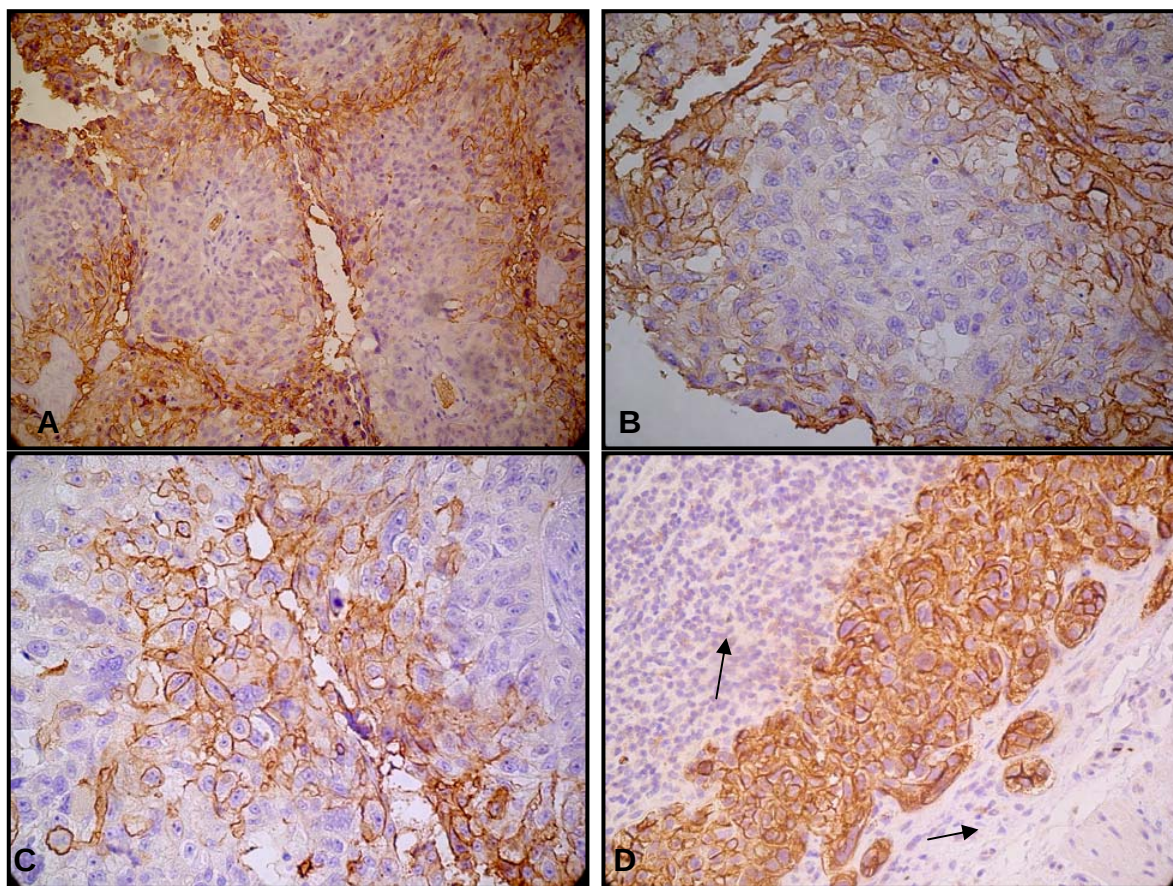
Expressão Protéica	Resultado	No.	%
GLUT-1	Negativo	3	13
	Positivo (fraco)	15	65,2
	Positivo (médio)	3	13
	Positivo (forte)	2	8,7
GLUT-3	Negativo	18	78,3
	Positivo (fraco)	2	8,7
	Positivo (forte)	1	4,4
	Nuclear	2	8,7
		23	100,0
Total			

*Foi excluído da análise um caso que não apresentava tumor na amostra, confirmado por biópsia.



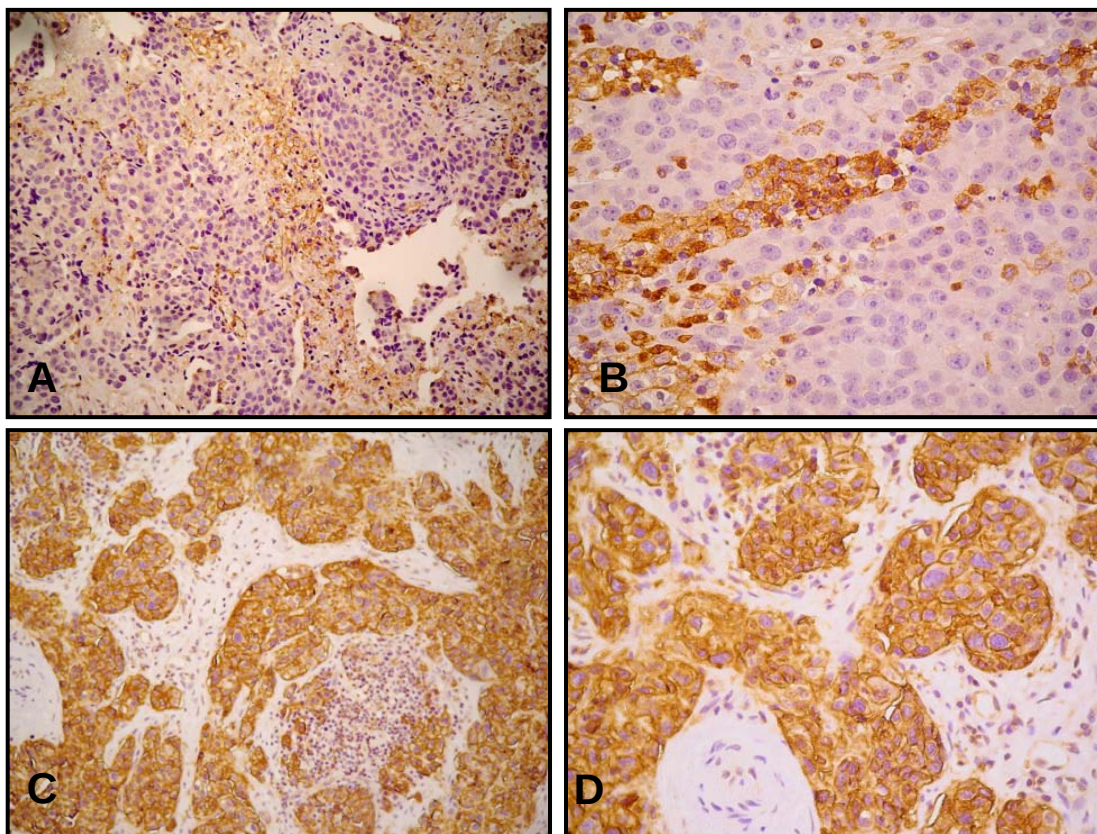
Legenda - (A) caso negativo demonstrando controle interno positivo em eritrócitos (seta), 400x; (B) caso positivo 1+, 200x; (C) caso positivo 2+, 200x; (D) caso positivo 3+, 400x.

Figura 6 - GLUT-1: Imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de adenocarcinoma metastático de ovário.



Legenda - (A) caso positivo 2+, bem diferenciado; 200x (B) 400x, marcação positiva periférica (C) caso positivo 2+, pouco diferenciado, marcação positiva central, 400x; (D) 200X, caso positivo +2, destacando células inflamatórias adjacentes negativas (setas).

Figura 7 - GLUT-1: Imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de adenocarcinoma metastático de ovário.



Legenda - (A) caso negativo, 200x; (B) Ausência de marcação, mostrando expressão de GLUT-3 em células inflamatórias, 400x; (C) marcação positiva na membrana das células +3, 200x; (D) 400x.

Figura 8 - GLUT-3: Imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de adenocarcinoma metastático de ovário.

D Expressão de GLUT-1 e GLUT-3 e os achados do Pet Scan:

A recorrência foi definida como uma doença, através de exames clínicos, anátomo-patológicos, citológicos, imagem e CA-125. Dos 24 casos analisados de recidiva ovariana, um caso foi excluído por não representar tumor, todos os demais pacientes foram submetidos ao Pet Scan para avaliar recorrência, sendo que 87% (20/23 casos) com resultados positivos, 13% (3/23 casos) com resultados negativos.

A análise da distribuição entre a expressão de GLUT-1 e GLUT-3 e os achados do Pet scan está disposta nas Tabelas 7 e 8.

Dos 23 casos avaliáveis, 20 apresentavam Pet Scan positivos e apenas três eram Pet Scan negativos. Dos casos positivos, 18 eram positivos para GLUT-1 e dois casos não mostravam a expressão do marcador. Daqueles em que o Pet Scan não encontrou sinais de recidiva, dois deles o tumor era GLUT-1 positivos e um GLUT-1 negativo.

Estas concordâncias não eram tão boas quando se analisou a relação Pet Scan e expressão de GLUT-3. Em apenas cinco casos o Pet scan positivo correspondeu à expressão de GLUT-3 pelo tumor, sendo em 15 casos negativos para GLUT-3. Todos os casos de Pet Scan negativos eram também negativos para a expressão de GLUT-3.

Tabela 7 - Distribuição da expressão de **GLUT-1/GLUT-3** de acordo com os achados do Pet Scan em pacientes com recorrência ovariana.

Pacientes	idade	Pet	GLUT-1	GLUT-3	Recorrência	Histologia
1	44	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso
2	43	Positivo	Fraco	Fraco	Sim	Adenoca seroso
3	45	Positivo	Médio	Negativo	Sim	Adenoca seroso
4	79	Positivo	Médio	Negativo	Sim	Adenoca seroso
5	74	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca de cls claras
6	61	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso
7	39	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso
8	68	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso
9	59	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso
10	61	Positivo	Negativo	Nuclear	Sim	Adenoca seroso
11	79	Positivo	Médio	Negativo	Sim	Adenoca seroso
12	53	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso
13	58	Positivo	Fraco	Fraco	Sim	Adenoca seroso
14	56	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso
15	66	Positivo	Negativo	Nuclear	Sim	Adenoca seroso
16	68	Positivo	Forte	Forte	Sim	Adenoca seroso
17	67	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso
18	51	Positivo	Forte	Negativo	Sim	Adenoca de cls claras
19	61	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso
20	69	Positivo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso
21	46	Positivo	Negativo	Negativo	Não	Inflamação
22	32	Negativo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso
23	72	Negativo	Negativo	Negativo	Sim	Adenoca seroso
24	50	Negativo	Fraco	Negativo	Sim	Adenoca seroso

Adenoca seroso: Adenocarcinoma seroso

Adenoca de cls claras: Adenocarcinoma de células claras

Tabela 8 - Distribuição da expressão de **GLUT-1/GLUT-3** de acordo com os achados do Pet Scan em recidivas ovariana.

	GLUT-1 Pos	GLUT-1 Neg	GLUT-3 Pos	GLUT-3 Neg
Pet Scan Pos (n=20)	18	2	5	15
Pet Scan Neg (n=3)	2	1	0	3

Pos: positivo
Neg: negativo

4.1.2 Análise da expressão de GLUT e CECp da boca

a) Dados Clínico-Patológicos

Foram analisados 142 casos cirúrgicos de CECp da cavidade oral. Os dados clínico-patológicos estão sumarizados na Tabela 9. Estão incluídos nessa casuística, 112 homens e 30 mulheres, compostos na sua maioria por indivíduos de cor branca (85,9%).

O tempo de seguimento desses casos selecionados variou de 1 dia a 157,6 meses, com mediana de 64,9 meses e média de 68,9 meses. A idade dos pacientes variou de 30 a 90 anos, mediana de 57 anos e média de 56,6 anos.

Em relação à história clínica desses pacientes encontramos que a grande maioria deles (88,6%) era tabagista no momento da pesquisa, 15 pacientes (10,6%) não fumavam e 11 casos (7,7%) não puderam ser avaliados. Eram também freqüentes consumidores de álcool (79,4%), 27 pacientes (20,6%) não ingeriam álcool e 11 casos (7,7%) não puderam ser avaliados. Baseados no sítio da lesão, 54 casos (38%) estão associados à língua, 6 casos (4,2%) a gengiva superior, 14 casos (9,9%) a gengiva inferior, 42 casos (29,6%) ao assoalho da boca, 1 caso (0,7%) ao palato, 19

casos (13,4%) ao retromolar e seis casos (4,2%) a jugal. A maioria dos casos diagnosticados encontrava-se em estadios avançados (III/IV), com 73,9% (n=105) e 26,1% (n=37) em estadios iniciais (I/II). Foram feitos esvaziamentos cervicais em 129 pacientes (90,8%), mas em 13 casos (9,2%) não foram feitos. Dentre os casos que foram submetidos a esvaziamento cervical, 70 pacientes (49,3%) apresentaram comprometimento linfonodal e 59 casos (41,5%) não o apresentaram. Desses 70 pacientes com comprometimento linfonodal, 31 casos (21,8%) apresentaram ruptura capsular e 24 pacientes (16,9%) não apresentaram. Em relação ao tratamento recebido, 86 pacientes (60,6%) foram submetidos à cirurgia com radioterapia combinada, 56 casos (39,4%) apenas realizaram cirurgia. De acordo com a invasão vascular, foi presente em 53 casos (37,3%) e ausente em 75 casos (52,8%), 14 casos (9,9%) não foram avaliados. A infiltração perineural foi observada em 55 dos casos (38,7%) e ausente em 72 casos (50,7%), 15 casos (10,6%) não havia informação no prontuário.

A maioria dos casos possuía margens livres (81%) e comprometidas em 25%. Dois casos não puderam ser avaliados.

Em relação à recorrência, em 92 casos (64,8%) não houve recidiva e 50 casos (35,2%) recorreram. A maioria sofreu recorrência local, 28,8% (n=41), 4,9% recorreram em outros lugares (n=7), 1,4% (n=2) com recorrência local e a distância.

Ao fim do seguimento, 142 casos foram separados de acordo com a evolução da doença em vivos sem doença (43%), vivos com doença (1,4%),

morte devido à doença (31,7%), morte por outras causas (18,3%) e perdidos de vista (5,6%). Estes dados estão resumidos na Tabela 9.

Tabela 9 - Sumário dos dados clínico-patológicos dos 142 casos de CECP da cavidade oral analisados nesse estudo.

Variável	Categoria	Número de casos (%)
Gênero (n=142)	Masculino	112 (78,9)
	Feminino	30 (21,1)
Cor (n=142)	Branco	122 (85,9)
	Não-branco	20 (14,1)
Tabaco (n=142)	Não	15 (10,6)
	Leve	99 (69,7)
	Moderado/severo	17 (12)
	Ignorados	11 (7,7)
Álcool (n=142)	Não	27 (19,0)
	Leve	89 (62,7)
	Moderado/severo	15 (10,6)
	Ignorados	11 (7,7)
Sítio primário (n=142)	Língua	54 (38)
	Gengiva	20 (14,1)
	Assoalho da boca	42 (29,6)
	Palato	1 (0,7)
	Jugal	6 (4,2)
	Retromolar	19 (13,4)
Invasão Vascular (n=142)	Não observado	75 (52,8)
	Sim	53 (37,3)
	Ignorados	14 (9,9)
Estadio clínico (n=142)	Iniciais(I/II)	37 (26,1)
	Avançado(II/IV)	105 (73,9)
Recorrência (n=142)	Não	92 (64,8)
	Sim	50 (35,2)
Sítio de Recorrência (n=142)	Local	41 (28,8)
	Outros	7 (4,9)
	Local/outros	2 (1,4)
	Sem recorrência	92 (64,8)
Status na última observação (n=142)	Vivos com a Doença	2 (1,4)
	Vivos sem a Doença	61 (43)
	Morte devido a Doença	45 (31,7)
	Morte devido a outras causas	26 (18,3)
	Perdidos de Vista	8 (5,6)

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA

4.2.1 Perfil da expressão de GLUT-1 e GLUT-3

A expressão de GLUT-1 foi avaliada em 135 casos, sendo que 7 casos (4,9%) não puderam ser avaliados por perda de material, descolamento, e/ou na representação no TMA. Isto representa uma perda de 5% dos casos pela técnica de TMA. Vale ressaltar que os casos para GLUT-1 foram divididos de acordo com o padrão da expressão da marcação: membrana, núcleo ou membrana e núcleo. E, de acordo com o número de células marcadas: parcial ou total. Sendo o padrão de expressão agrupado em duas categorias: M- membrana e MN/N- membrana, núcleo/núcleo e ainda estratificado de acordo com o número de células marcadas em: MP- membrana parcial, MT-membrana total, MNP- membrana, núcleo parcial e MNT- membrana, núcleo total.

A expressão protéica de GLUT-3 foi analisada em 142 casos e foram divididos em casos positivos (membrana) ou negativos, parciais ou totais.

Esses resultados foram obtidos pela análise em quadruplicata das lâminas.

Notou-se uma alta positividade de tumores epiteliais com a proteína GLUT-1 do que com a proteína GLUT-3.

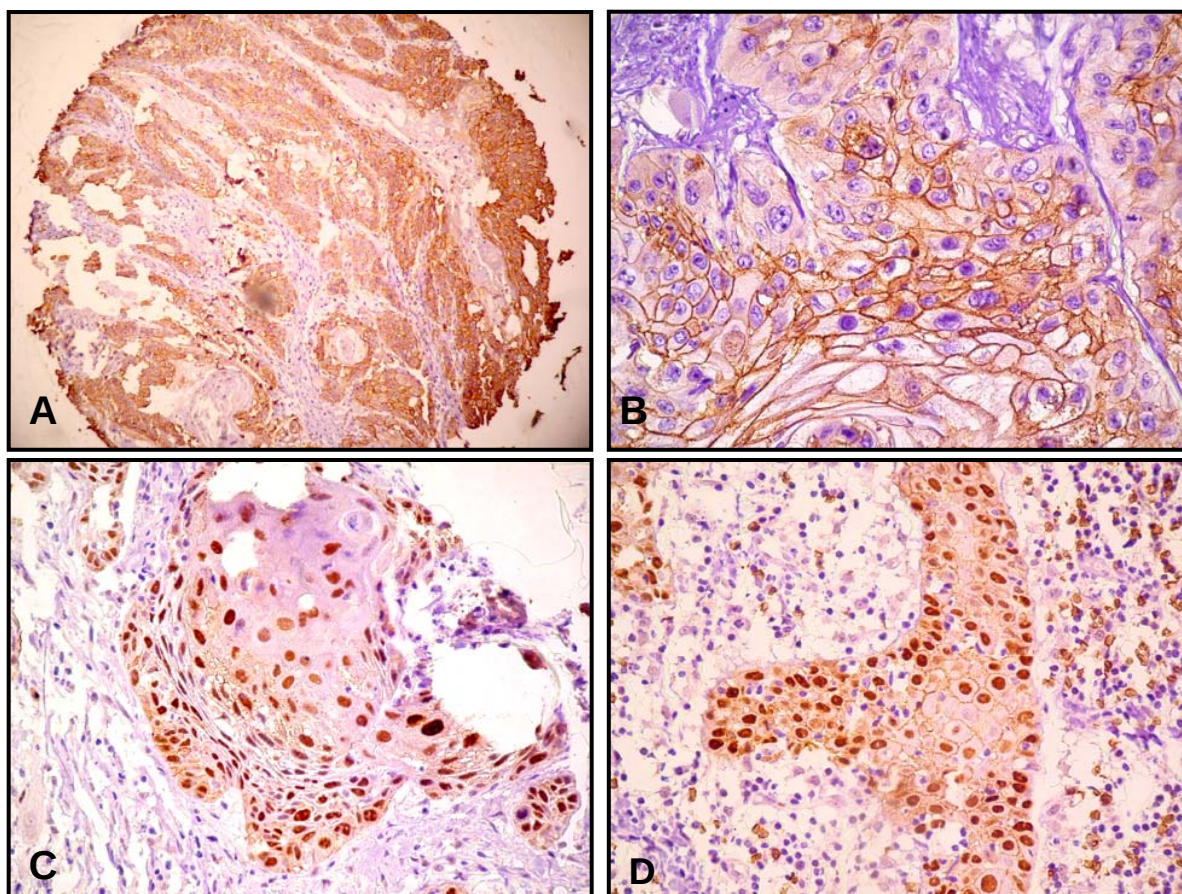
Os resultados da análise estão descritos na Tabela 10.

a) Expressão de GLUT-1 e GLUT-3 e Padrão da marcação

A imunoexpressão de GLUT-1 foi positiva em todos os casos examinados como parte desse estudo.

A análise imunoistoquímica da GLUT-1 mostrou presença de expressão positiva na membrana (M) em 68/135 casos (50,3%), no núcleo (N) em 4/135 casos (3%), na membrana/núcleo (MN) em 63/135 casos (46,7%) (Figura 9).

Quando analisada a expressão protéica de GLUT-3, encontramos 30 casos (21,1%) positivos e 112 casos (78,9%) negativos.



Legenda - (A) "Core" de CECP bucal, marcação em membrana, 100x, (B) 400x; (C) marcação nuclear, 200x; (D) marcação em membrana e nuclear, 200x.

Figura 9 - GLUT-1: Imunoistoquímica mostrando marcação na membrana de CECP.

b) Expressão de GLUT-1 e GLUT-3 em CEC da cavidade oral:

Número de células marcadas (Parcial ou Total)

Esses dados estão resumidos na Tabela 10.

Em relação à frequência de GLUT-1, observamos 58 casos (40,8%) com expressão parcial e 77 casos (54,2%) com expressão total. Quando estratificado em número de células e padrão observamos a maior expressão de GLUT-1 em MNT com 44 casos (31%), 35 casos (24,6%) com marcação MP, 33 casos (23,2%) com marcação MT e 23 casos (16,2%) com marcação MNP (Figura 10).

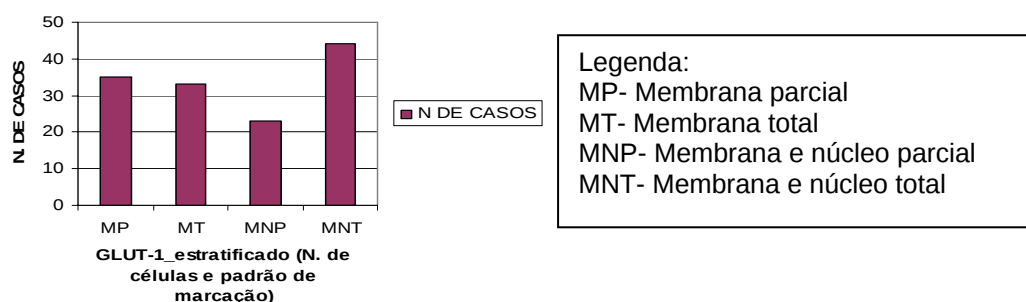
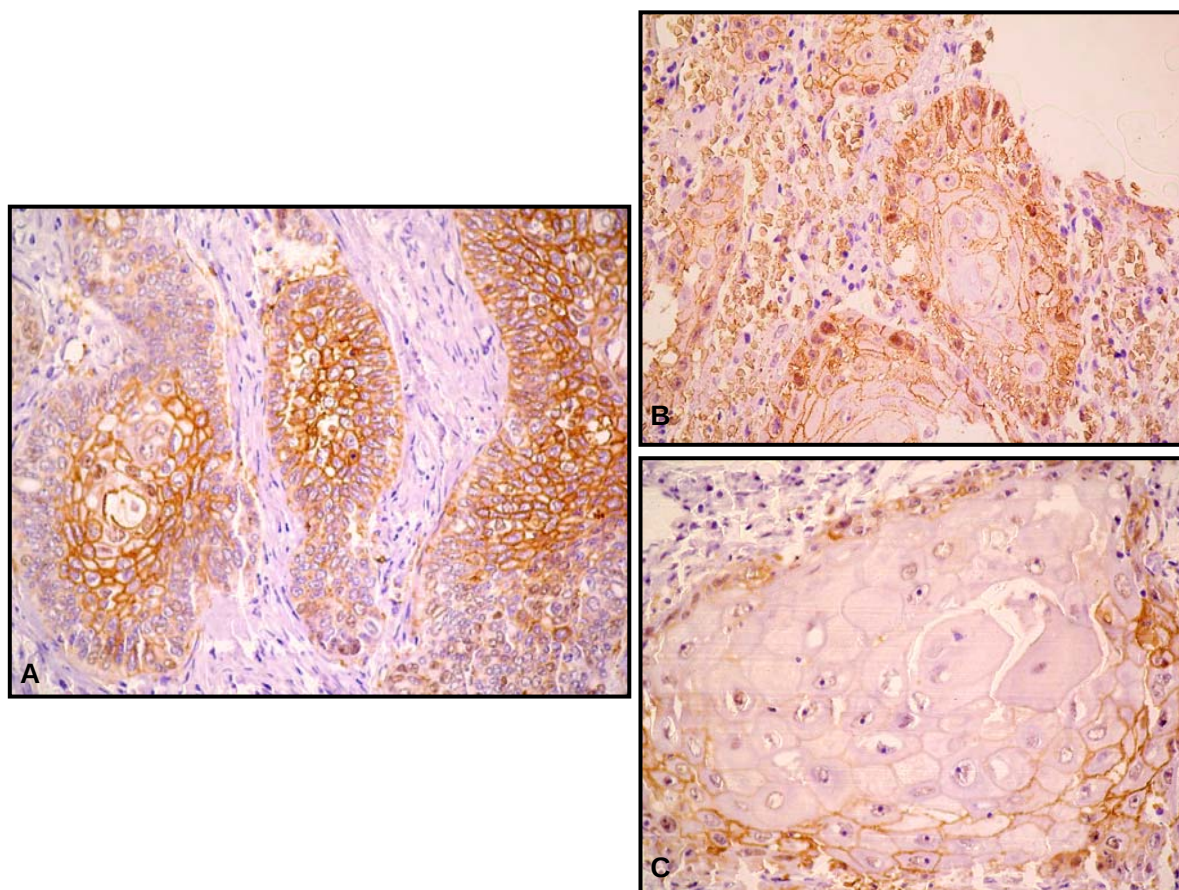


Figura 10 - Gráfico de expressão imunoistoquímica de GLUT-1 em CEC.

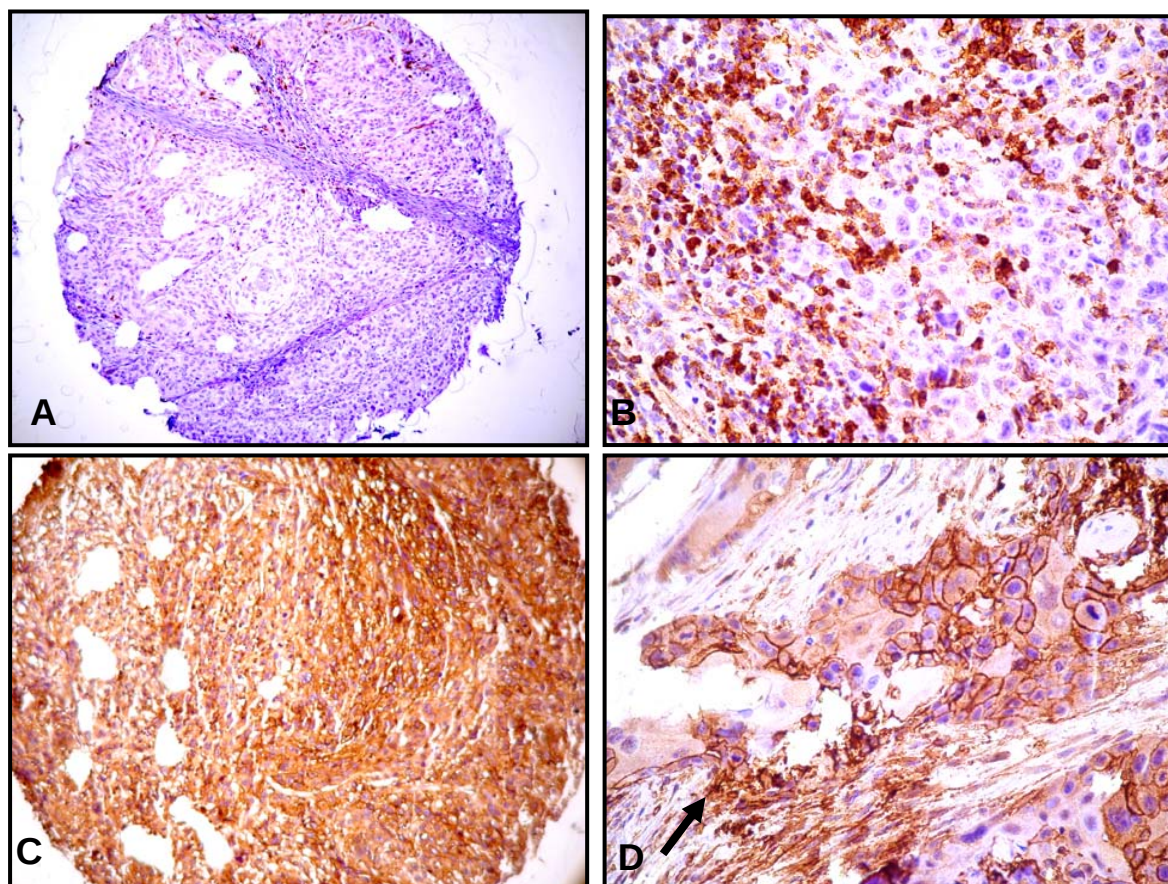
A expressão de GLUT-1 nas análises tumorais predominou na periferia do tumor e foi ausente no centro de tumores bem e moderadamente diferenciados (Figura 11). Com a progressão do tumor, a expressão de GLUT -1 vai se tornando gradualmente mais forte e homogênea em todos os níveis, observando-se uma possível correlação entre a expressão de GLUT -1 e a progressão tumoral.

Dos casos positivos para GLUT-3, 29 casos (20,4%) apresentaram expressão parcial e somente um caso (0,7%) apresentou expressão total (Figura 12).



Legenda - A: Expressão predominando no centro do tumor; 100X B: Expressão do marcador predominando na periferia do tumor; marcação em membrana e núcleo, 200X; C: Expressão em membrana, 400x.

Figura 11 - GLUT-1: Expressão imunoistoquímica demonstrando marcação na membrana de CECP (TMA).



Legenda - A: "core" de CECP em TMA com expressão negativa para GLUT-3, 100x.; B: Expressão negativa com destaque para marcação positiva nas células inflamatórias, 200x, C: Expressão positiva, 100x; D: Expressão positiva, mostrando também marcação em células do infiltrado inflamatório (seta), 200x.

Figura 12 - GLUT-3: Expressão na membrana das células em CECP.

Tabela 10 - Resultado geral dos marcadores em 142 casos de CEC da cavidade oral.

Anticorpo/Categoria	Resultado	No.	%
GLUT-1/ Padrão	M	68	47,9
	N	4	2,8
	MN	63	44,4
	N/A	7	4,9
GLUT-1/ Frequência	Parcial	58	40,8
	Total	77	54,2
	N/A	7	4,9
GLUT-1/ estratificado	MNT	44	31
	MP	35	24,6
	MT	33	23,2
	MNP	23	16,2
	N/A	7	4,9
GLUT-3/ Padrão	Negativo	112	78,9
	Membrana (M)	30	21,1
GLUT-3/ Frequência	Parcial	29	20,4
	Total	1	0,7
Total		142	100,0

M:Membrana;N:Núcleo; MN:Membrana e núcleo
N/A: casos não avaliáveis

4.2.2 GLUT-1 e GLUT-3: Associação com dados clínico-patológicos

A análise da associação da proteína GLUT-1 e GLUT-3 com os fatores clínico-patológicos estão descritos nas Tabelas 11, a a c e 12.

A GLUT-1 e Padrão de marcação

Relação com o gênero do paciente: Encontrou-se associação com de GLUT-1/ padrão (M,M/N e N) com o gênero do paciente ($p=0,017$). Houve forte associação com o sexo masculino ($p=0,008$) quando estratificado em número de células e padrão. Estas diferenças se devem ao fato que os tumores em homens expressam mais frequência, casos em que praticamente todas as células se coram (expressão total). Não houve associação quando o padrão foi agrupado (M e MN/N).

Relação com o consumo alcoólico: Encontrou-se associação com de GLUT-1/padrão (M, M/N e N) ($p=0,004$) com o consumo de álcool. Encontrou-se diferença estatisticamente significativa quando o GLUT-1 foi agrupado (M e MN/N) ($p=0,042$). Houve associação estatisticamente significativa com essa variável quando estratificado o padrão de marcação ($p=0,017$), mostrando que o número de células marcadas é mais importante do que a localização da marcação. Houve uma forte associação estatisticamente significante entre o consumo de álcool e o sexo masculino ($p<0,0001$), representando ser o maior fator de risco que o sexo feminino.

Relação com o estadiamento clínico: Não foi observada associação estatística entre a expressão de GLUT-1/padrão (M, M/N e N) e o estadio clínico do paciente, quando agrupado (M, MN/N) e quando estratificado ($p>0,005$).

Relação com embolização vascular: O local da marcação de GLUT-1 não apresentou associação estatisticamente significativa com embolização vascular. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a

embolização vascular e o estadió clínico ($p=0,034$), apresentou uma maior proporção de invasão vascular presente nos casos mais avançados.

B GLUT-3 e Padrão de marcação

Relação com o gênero do paciente: Não se observou associação de GLUT-3 com o gênero do paciente.

Relação com o consumo alcoólico: Não se observou associação de GLUT-3 com o consumo de álcool.

Relação com o estadiamento clínico: Observou-se que a expressão de GLUT-3 mostrou uma associação inversa com o estadió clínico do tumor primário ($p=0,005$). Os casos negativos dessa proteína foram mais freqüentes em tumores mais avançados (III/IV).

Relação com embolização vascular: A expressão da proteína GLUT-3 apresentou uma associação estatisticamente significativa com essa variável ($p=0,005$).

C GLUT-1: Número de células marcadas

Relação com o gênero do paciente: Observou-se uma forte associação de GLUT-1/freqüência e o gênero do paciente ($p=0,001$). Onde encontramos a maioria das células marcadas em relação ao sexo masculino.

Relação com o consumo alcoólico: A expressão de GLUT-1 mostrou uma forte associação estatística com o consumo de álcool ($p=0,030$), apresentando maior risco quanto maior for o número de células marcadas.

Relação com o estadiamento clínico: A expressão de GLUT-1 apresentou associação estatisticamente significativa com o estadiamento clínico ($p=0,028$), mostrando uma marcação mais homogênea com estadio avançado do tumor (III/IV).

Relação com embolização vascular: A frequência de células marcadas de GLUT-1 não apresentou associação estatisticamente significativa com embolização vascular.

D GLUT-3: Número de células marcadas

Dos casos positivos para GLUT-3, 29 casos (20,4%) apresentaram expressão parcial e somente um caso (0,7%) apresentou expressão total, por isso, não foi avaliada a expressão dessa proteína de acordo com a frequência de células coradas.

A expressão de GLUT-1 e GLUT-3 não apresentaram alguma associação estatisticamente significativa com outras variáveis como: raça, consumo de tabaco, sítio primário, número de linfonodos comprometidos, ruptura capsular e infiltração perineural.

Tabela 11 - Análise da associação entre a expressão de GLUT-1 e fatores clínico-patológicos em CECp.

Variável (n=135)	Categoria	GLUT-1/padrão			p
		M	N	MN	
Gênero	Masculino	53(39,3)	1(0,7)	53(39,3)	0,017
	Feminino	15(11,1)	2(2,2)	10(20,7)	
Consumo de álcool	Não	14(11,3)	3(2,4)	8(6,5)	0,004
	Leve	37(29,8)	1(0,8)	47(37,9)	
	Moderado/severo	11(8,9)	0	3(2,4)	
Estadio clínico	I/II	19(14,1)	1(0,7)	15(11,1)	0,864
	III/IV	49(36,3)	3(2,2)	48(35,6)	
Embolização Vascular	Não	31(25,6)	2(1,7)	36(29,8)	0,492
	Sim	29(24)	1(0,8)	22(18,2)	

M- Membrana

MN- Membrana e núcleo

p valor

Tabela 11 a - Análise da associação entre a expressão de GLUT-1 e fatores clínico-patológicos em CECp.

Variável (n=135)	Categoria	GLUT-1/padrão agrupado		
		M	MN/N	p
Gênero	Masculino	53(39,3)	54(40)	0,832
	Feminino	15(11,1)	13(9,6)	
Consumo de álcool	Não	14(11,3)	11(8,9)	0,042
	Leve	37(29,8)	48(38,7)	
	Moderado/severo	11(8,9)	3(2,4)	
Estadio clínico	I/II	19(14,1)	16(11,9)	0,695
	III/IV	49(36,3)	51(37,8)	
Embolização Vascular	Não	31(25,6)	38(31,4)	0,273
	Sim	29(24)	23(19)	

M- Membrana

MN/N- Membrana e núcleo /Núcleo

p valor

Tabela 11 b - Análise da associação entre a expressão de GLUT-1 e fatores clínico-patológicos em CECp.

Variável (n=135)	Categoria	Parcial (%)	GLUT-1/frequência	
			Total (%)	p
Gênero	Masculino	38(28,1)	69(51,1)	0,001
	Feminino	20(14,8)	8(5,9)	
Consumo de álcool	Não	16(12,9)	9(7,3)	0,030
	Leve	36(29)	49(39,5)	
	Moderado/severo	3(2,4)	11(8,9)	
Estadio clínico	I/II	21(15,6)	14(25,9)	0,028
	III/IV	37(27,4)	63(46,7)	
Embolização Vascular	Não	30(24,8)	39(32,2)	0,461
	Sim	19(15,7)	33(27,3)	

p: p valor

Tabela 11 c - Análise da associação entre a expressão de GLUT-1 e fatores clínico-patológicos em CECp.

Variável (n=135)	Categoria	GLUT-1/padrão estratificado				p
		MP (%)	MT (%)	MNP (%)	MNT(%)	
Gênero	Masculino	23(17)	30(22,2)	15(11,1)	39(28,9)	0,008
	Feminino	12(8,9)	3(2,2)	8(5,9)	5(3,7)	
Consumo de álcool	Não	10(8,1)	4(13,7)	6(4,8)	5(4,0)	0,017
	Leve	20(16,1)	17(13,7)	16(12,9)	32(25,8)	
	Moderado/severo	3(2,4)	8(6,5)	0	3(2,4)	
Estadio clínico	I/II	12(8,9)	7(5,2)	9(6,7)	7(5,2)	0,110
	III/IV	23(17)	26(19,3)	14(10,4)	37(27,4)	
Embolização Vascular	Não	15(12,4)	16(13,2)	15(12,4)	23(19)	0,464
	Sim	13(10,7)	16(13,2)	6(5,0)	17(14)	

MP- Membrana parcial; **MT**- Membrana total; **MNP**- Membrana e núcleo parcial;
MNT- Membrana e núcleo total; **P**: Parcial; **T**: Total; **p**: p valor.

Tabela 12 - Análise da associação entre a expressão de GLUT-3 e fatores clínico-patológicos em CECp.

Variável (n=142)	Categoria	GLUT-3		p
		Positivo(%)	Negativo(%)	
Gênero	Masculino	87(61,3)	25(17,6)	0,619
	Feminino	25(17,6)	5(3,5)	
Consumo de álcool	Não	3(2,3)	24(18,3)	0,316
	Leve	22(16,8)	67(51,1)	
	Moderado/severo	3(2,3)	12(9,2)	
Consumo de Tabaco	Não	1(0,8)	14(10,7)	0,279
	Leve	24(18,3)	75(57,3)	
	Moderado/severo	3(2,3)	14(10,7)	
Estadio clínico	I/II	2(1,4)	35(24,6)	0,005
	III/IV	28(19,7)	77(54,2)	
Embolização vascular	Não	10(7,8)	65(50,8)	0,005
	Sim	19(14,8)	34(26,6)	

p: p valor

4.2.3 Associação entre os marcadores GLUT-1 e GLUT-3:

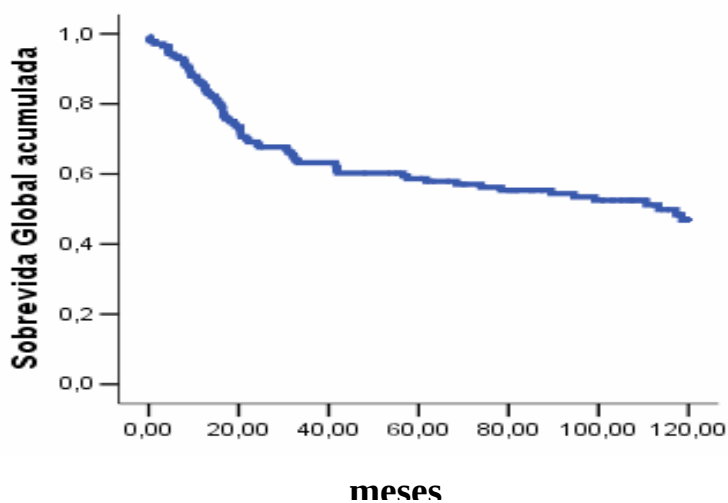
Não foi observada diferença significativa entre a expressão dos marcadores estudados nesse trabalho ($p=0,059$). Apesar disso, foi observada uma tendência à significância estatística na associação entre GLUT-1 e GLUT-3 em que os casos positivos para GLUT-3 ocorreram com mais frequência em marcação mais homogênea para GLUT-1 (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise da associação entre os marcadores GLUT-1 e GLUT-3.

Marcador	Categoria	GLUT-1/padrão agrupado				
		M	MN/N	p		
GLUT-3 (n=135)	Negativo	51(37,8)	54(40)	0,535		
	Positivo	17(12,6)	13(9,6)			
GLUT-1/padrão estratificado						
		MP (%)	MT (%)	MNP (%)	MNT(%)	p
GLUT-3 (n=135)	Negativo	28(20,7)	23(17)	22(16,3)	32(23,7)	0,1
	Positivo	7(5,2)	10(7,4)	1(0,7)	12(8,9)	
GLUT-1/freqüência						
		P (%)	T (%)	p		
GLUT-3 (n=135)	Negativo	50(37)	55(40,7)	0,059		
	Positivo	8(5,9)	22(16,3)			

4.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL EM CEC DA CAVIDADE ORAL

A análise de sobrevida global nos casos de CEC oral mostrou estimativas de sobrevida em 5 anos de 52,1% (Figura 13).

**Figura 13** - Curva de Sobrevida Global dos casos de CEC oral estudados.

4.3.1 Sobrevida Global e Expressão de Marcadores: GLUT-1 e GLUT-3

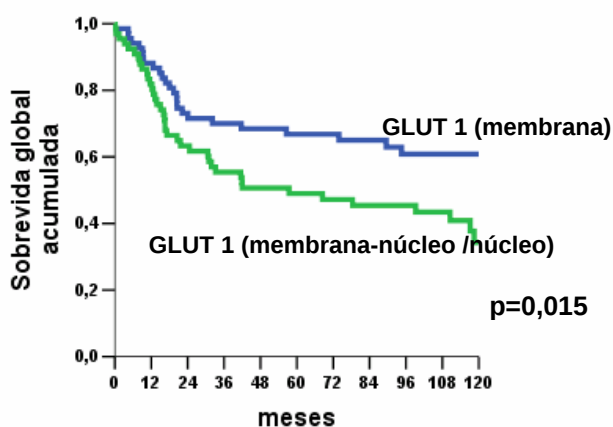
Para análise de sobrevida global, foram agrupados os padrões de marcação de GLUT-1.

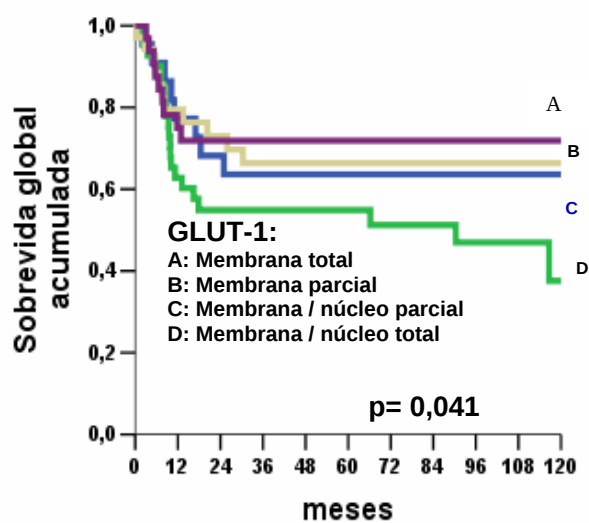
As análises de sobrevida global demonstraram a existência de diferenças significativas entre sobrevida global e expressão protéica de GLUT-1 e GLUT-3. Observou-se uma menor taxa de sobrevida global associada à marcação positiva de GLUT-1 no núcleo e na membrana simultaneamente ($p=0,015$) (Figura 14a).

A análise de sobrevida global foi estatisticamente significativa quando a categoria de marcação da imunoexpressão de GLUT-1 foi estratificada ($p=0,041$), observou-se que a marcação na membrana e núcleo de forma homogênea no tumor estava associada a um pior prognóstico em relação aos demais casos (Figura 14a).

Em relação ao GLUT-3, observou-se uma forte associação estatística com sobrevida global ($p=0,002$), demonstrando que a baixa estimativa de sobrevida global está associada à forte marcação positiva de GLUT-3 (Figura 14b).

a)





b)

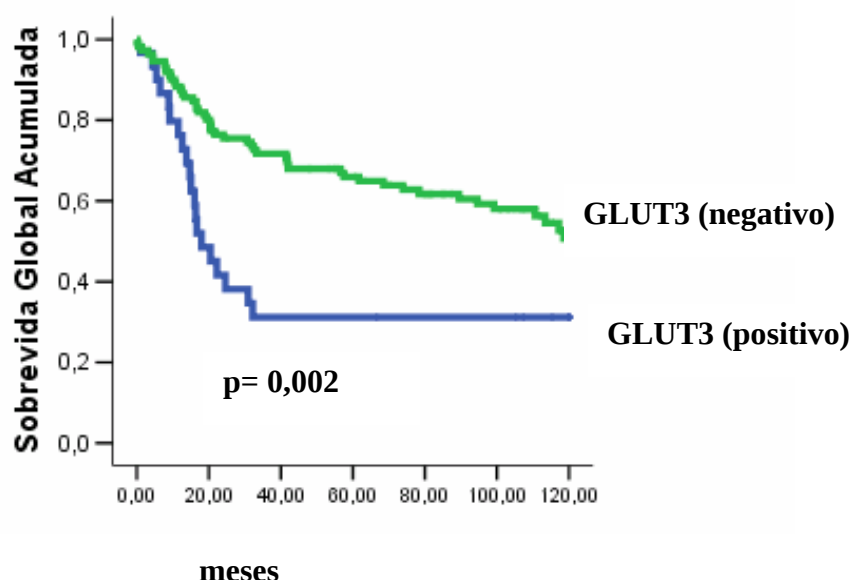


Figura 14 a e b - Influência da expressão dos marcadores nas curvas de Sobrevida Global. (a) GLUT-1; (b) GLUT-3.

4.3.2 Sobrevida Livre de Doença em CEC da cavidade oral

A análise de sobrevida livre de doença em 5 anos nos casos de CEC oral foi de 64,8% (Figura 15).

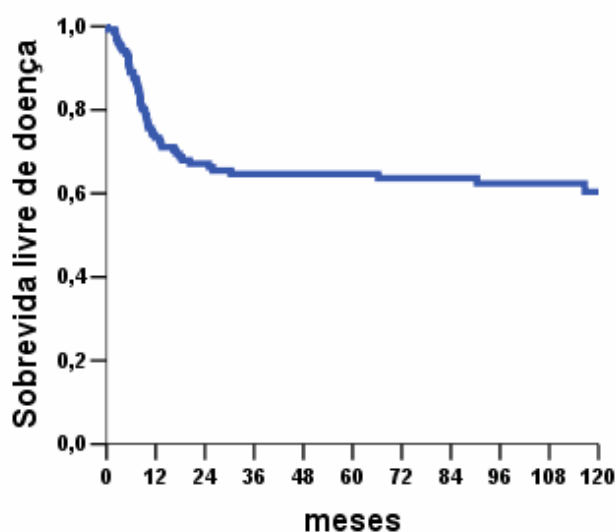


Figura 15 - Curva de Sobrevida livre de doença.

4.3.3 Sobrevida Livre de Doença e Expressão dos Marcadores: GLUT-1 e Glut-3.

Nas análises de sobrevida livre de doença, observou-se diferença significativa entre sobrevida livre de doença e expressão protéica de GLUT-3 ($p=0,021$), os casos com marcação positiva mostraram menor taxa de sobrevida livre de doença (Figura 16).

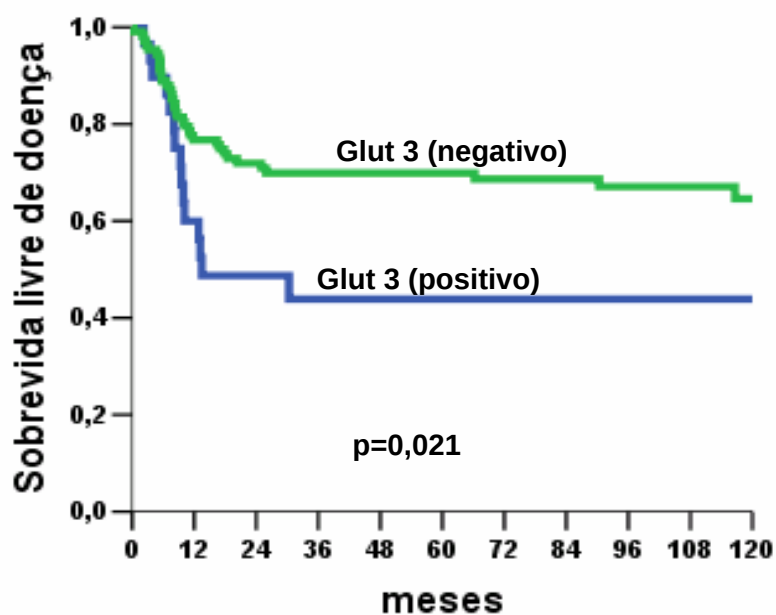


Figura 16 - Influência da expressão de GLUT-3 na curva de Sobrevida livre de doença.

4.4 ANÁLISE MULTIVARIADA

De acordo com a análise multivariada, observou-se que o estadiamento clínico permaneceu como fator prognóstico independente para recorrência ($p=0,006$) (Tabela 14). Pacientes apresentaram maior recorrência da doença nos estadios mais avançados (III/IV).

Considerando-se a sobrevida global, no modelo final da análise multivariada, permaneceram como fatores independentes: a embolização vascular ($p=0,002$), a expressão de GLUT-1 ($p=0,006$) e a expressão de GLUT-3 ($p=0,018$) (Tabela 15).

Tabela 14 - Análise multivariada, pelo modelo de regressão de Cox em relação à sobrevida livre de doença.

Variável	Categoria	HR (95% IC)	p valor
Estadio clínico	I/II	1,0 (ref.)	
	III/IV	3,304(1,407-7,762)	0,006

Tabela 15 - Análise multivariada, pelo modelo de regressão de Cox em relação à sobrevida global.

Variável	Categoria	HR (95% IC)	p valor
Embolização vascular	Não	1,0 (ref.)	
	Sim	2,165 (1,295-3,618)	0,003
GLUT-1	(grupo)	1,0(ref.)	
GLUT-1/padrão	(grupo 1)	2,066(1,232-3,464)	0,006
GLUT-3	Negativo	1,0 (ref.)	
	Positivo	1,933(1,119-3,339)	0,018

Legenda:

GLUT-1/ padrão:

M- membrana

MN/N- membrana e núcleo/ núcleo

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE GLICOSE (GLUT-1 E GLUT-3) DE ACORDO COM OS ACHADOS DE PET SCAN

A utilização de imagens através da captação de ^{18}F -FDG pelo Pet Scan tem sido aplicada há aproximadamente uma década e tomou grande impulso mais recentemente. O uso das propriedades metabólicas do tumor para se estabelecer um padrão de imagens é mais sensível do que a imagem anatômica isoladamente. Com isso, o uso de Pet Scan tem sido cada vez mais freqüente, especialmente no estadiamento clínico e na pesquisa de recidivas tumorais.

A glicose é a maior fonte de energia para as células humanas normais e tumorais. Esta característica celular é o ponto principal na caracterização do Pet Scan, que se baseia na captura de um análogo da glicose, o ^{18}F -FDG, para formar as suas imagens. Em virtude de suas características hidrofílicas, proteínas carreadoras específicas são necessárias para que a glicose passe a membrana plasmática. Estas estão presentes em todos os tipos celulares e são conhecidas como GLUTs. Como o exame de Pet Scan usa esta propriedade metabólica dos tumores, é bastante intuitivo se pressupor que a captação de ^{18}F -FDG esteja na dependência da expressão de alguma molécula da família das GLUTs pelas células tumorais. O

presente estudo mostra que há uma boa relação entre a expressão de GLUT, especialmente GLUT-1, e o resultado do exame de Pet Scan, embora esta relação não seja perfeita.

O mecanismo de captação de ^{18}F -FDG pelos tumores tem sido amplamente estudado *in vitro* e em *in vivo*. Alguns modelos de estudos animais demonstraram que o FDG é transportado, fosforilado e finalmente acumulado dentro do tumor (HABERKORN et al. 1991). Em lesões inflamatórias, como outros estudos mostraram, o FDG primeiramente se acumula dentro e ao redor dessas lesões (BUSTAMANTE et al. 1981; KUBOTA et al. 1992; YAMADA et al. 1995).

Casos de Pet Scan positivos sem que as células tumorais expressem GLUT levam a crer que o transporte de ^{18}F -FDG pode não depender da presença de GLUT. Em estudos de modelos animais, encontraram que o mecanismo celular de utilização de FDG pode não estar associado com as proteínas transportadoras de glicose, nem com hexoquinases, nem com glicose-6-fosfatase para se acumular na célula (NELSON et al. 1996). ALOJ et al. (1999) realizaram experimentos de cultura de células e sugeriram que a captação de FDG correlaciona-se mais com a atividade de fosforilação da glicose mitocondrial do que com a expressão de GLUT-1 ou hexoquinase I.

Células malignas mostram um aumento na captação de glicose *in vitro* e *in vivo*. Durante o desenvolvimento do câncer, segundo alguns estudos (HEBER et al. 1992; MELLANEN et al. 1994; MAROM et al. 2001), sugeriram um possível envolvimento do tumor com os tecidos do hospedeiro. As proteínas GLUT-1 e GLUT-3 mediam largamente o

transporte basal da glicose em câncer, facilitando a manutenção do metabolismo de energia glicolítica em casos limitados de suprimento em regiões moderadamente ou pobremente perfundidos (KALLINOWSKI et al. 1989; MELLANEN et al. 1994). Há poucos trabalhos relacionando a atividade de FDG e as proteínas transportadoras de glicose em cânceres humanos.

Embora o número de casos nesse presente trabalho seja pequeno, houve uma boa relação entre os achados de Pet Scan e os resultados das imunoexpressões de proteínas transportadoras de glicose aqui pesquisadas, concordando com alguns autores (HUBNER et al. 1993; TIAN et al. 2004). A grande maioria dos casos de Pet Scan positivos, tanto em CECP como em tumores de ovário metastáticos, foram positivos para GLUT-1. Dos 21 casos de Pet Scan positivos em CECP apenas dois foram GLUT-1 negativos e, de modo similar, dos 20 casos de Pet Scan positivos de carcinomas ovarianos metastáticos, dois foram GLUT-1 negativos. A mesma relação não foi encontrada em relação à expressão de GLUT-3. Entretanto, observamos que nas duas neoplasias há casos em que as células tumorais não expressam o marcador, mas mesmo assim o Pet Scan foi capaz de identificar estes tumores. Portanto, embora a relação seja muito boa, a negatividade para GLUT-1 não é suficiente para que estes pacientes não sejam explorados por Pet Scan.

A especificidade do Pet Scan é freqüentemente afetada por uma taxa de achados falso-positivos em processos inflamatórios, lesões próximas da mucosa ou ainda seguidos de biópsia prévia. O desenho deste estudo não

foi realizado para avaliar este aspecto, uma vez que partimos de casos positivos no Pet Scan. Nesse estudo, os 7 achados falso-positivos (6 de CECp e 1 de neoplasia ovariana) eram decorrentes de intenso processo inflamatório, aspecto estes já salientado por outros autores (CHEON et al. 1999; LAPELA et al. 2000; LOWE et al. 2000; DRESEL et al. 2003; SCHMIDT et al. 2004; ZHAO et al. 2005). As células componentes do processo inflamatório expressam intensamente GLUT-3 e isto pode ser um dos motivos para a intensa captação do ^{18}F -FDG.

Nos tumores epiteliais testados, GLUT-1 foi muito mais expresso do que GLUT-3. A grande maioria dos trabalhos na literatura mostram que a expressão de GLUT-1 é uma propriedade comum às neoplasias. A expressão de GLUT-1 foi comprovada em carcinomas epidermóides do colo do útero (AIRLEY et al. 2001), orais (KUNKEL et al. 2003), da cabeça e pescoço (MELLANEN et al. 1994) e da pele (BAER et al. 1997). BROWN et al. (1999) também observaram resultados semelhantes quando cinco diferentes GLUTs estavam expressas em carcinomas de não-pequenas células do pulmão. Os carcinomas oriundos do epitélio transicional da bexiga são positivos para GLUT-1 em 63% dos casos (CHANG et al. 2000). Em adenocarcinomas também é comum a expressão de GLUT-1, tais como carcinomas ductais de mama (BROWN et al. 1993; ALOJ et al. 2001; KANG et al. 2002), do cólon (HABER et al. 1998) e do pâncreas (HIGASHI et al. 1997), embora tumores gástricos sejam menos comumente positivos para GLUT-1 e somente aqueles do tipo intestinal (KIM et al. 2000; KAWAMURA et al. 2001). Isto pode não ser verdade para todos os tumores epiteliais.

CHANDLER et al. (2003) relataram que GLUT-12 é preferencialmente expressa (mRNA e proteína) quando comparada a GLUT-1 em adenocarcinomas de próstata. Os folículos linfóides reacionais podem ser positivos para GLUT-1 e com isso criar dificuldades na interpretação de linfonodos reacionais e seu diagnóstico diferencial com metástases pelo Pet Scan (CHUNG et al. 2006). Linfomas não-Hodgkin expressam raramente GLUT-1, mas por outro lado são quase sempre GLUT-3 positivos (AYALA et al. resultados não publicados).

Em resumo, embora haja uma excelente correspondência entre a expressão de GLUT-1 e o resultado positivo do Pet Scan, o presente trabalho demonstra que não se pode excluir um caso para o Pet Scan mesmo sem a expressão de GLUT, uma vez que há casos negativos para GLUT-1 que são positivos no Pet-Scan.

Embora não fosse o objetivo deste trabalho, algumas observações foram feitas em relação à expressão de GLUT em tumores ovarianos. Existem poucos trabalhos relacionando a expressão de GLUT-1 com câncer ovariano e alguns apresentando frequências discrepantes variando de 0 a 90% (CANTUÁRIA et al. 2001; RUDLOWSKI et al. 2004; KUOKAWA et al. 2004; OZCAN et al. 2005). Tais discrepâncias podem ser devido a diferenças na técnica de imunoistoquímica, origens distintas de anticorpos usados pelos diferentes autores ou, até mesmo ao critério utilizado para classificação dos casos, com diferentes “cut off”, além de análises subjetivas.

CANTUÁRIA et al. (2000), foram os primeiros a analisar a expressão de GLUT-1, estudando 113 tumores ovarianos, sendo 104 tumores epiteliais malignos. Eles encontraram um significativo aumento da expressão de GLUT-1 de tumores borderlines a tumores malignos. KALIR et al. (2002) analisaram a expressão de GLUT-1 em 122 tumores epiteliais de ovário e obtiveram resultados similares a CANTUÁRIA et al. (2000). Assim como nesses dois estudos, em nossos casos, altas taxas de expressão de GLUT-1 foram encontradas em tumores malignos ovarianos.

Um aspecto interessante foi a evidente expressão de GLUT-1 na ponta das papilas em carcinoma ovariano bem/moderadamente diferenciado, encontrado em nosso trabalho, fato este também relatado por outros autores (KALIR et al. 2002; WANG et al. 2002; RUDLOWSKI et al. 2004). Uma das possíveis explicações está na existência de compartimentos nas células epiteliais onde as proteínas transportadoras de glicose possam ancorar se ligando a filamentos corticais presentes nas papilas, possibilitando o transporte de glicose para dentro da célula (LANGE et al. 2002), o que reflete uma adaptação da demanda glicolítica local, devido à presença da hipóxia. Esse achado encontra suporte em outros tipos de câncer onde a imunorreatividade de GLUT-1 estava mais fortemente marcado no centro do tumor, pobremente diferenciado, aumentando com a distância dos vasos sanguíneos (HABER et al. 1998).

Adicionalmente, em alguns estudos prévios (GOLDFISCHER et al. 1996) a expressão de GLUT-1 na região periapical das papilas de tumores ovarianos borderlines, bem/moderadamente diferenciados, está consistente

com o conceito que GLUT-1 possa ser um marcador de progressão neoplásica, porque esse é um subtipo de tumor ovariano que se acredita ter um grande potencial de transformação maligna. Comparativamente, outros estudos identificaram a expressão de GLUT-1 como um marcador de progressão neoplásica em tumor colorretal (HABER et al. 1998).

Interessantemente, corroborando com os nossos resultados (CANTUÁRIA et al. 2000; KUOKAWA et al. 2004), indicaram uma frequência de expressão de GLUT-1 maior em tumores serosos do que em outros subtipos histológicos de câncer ovariano.

5.2 ASSOCIAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA DA EXPRESSÃO DE GLUT-1 E GLUT-3 EM CEC DE BOCA

No presente estudo, utilizamos o método *tissue microarray* (TMA) para avaliar uma ampla série de CEC da cavidade oral. A limitação mais discutida da técnica TMA é o tamanho das amostras dispostas nas lâminas. Vários estudos comparando resultados obtidos entre análises de TMA e de cortes correspondentes dispostos em lâminas convencionais mostraram que a heterogeneidade dos tumores não influenciava a identificação dos parâmetros prognósticos. Cada associação dos parâmetros clínicos ou morfológicos encontrada nos cortes convencionais, também foi detectada na análise de TMA. Outro ponto, é que a observação de 2-3 “*histo-spots*”, pode representar os padrões de expressão das proteínas vistos na análise das

lâminas convencionais (KONONEN et al. 1998; KALLIONIEMI et al. 2001; MOCH et al. 2001).

A questão se os dados do TMA podem reproduzir análises feitas nos cortes convencionais, é menos importante do que se as associações clinico-patológicas podem ser reproduzidas ou detectadas no TMA. De fato, estudos prévios de TMA puderam reproduzir inteiramente as associações conhecidas entre as alterações moleculares e o fenótipo do tumor (MUCCI et al. 2000; SIMON et al. 2005).

Para solucionar as potenciais limitações do método neste estudo, em matriz de TMA, para cada caso, dois *cores* diferentes foram dispostos em duplicata. Para as reações imunoistoquímicas, selecionamos duas lâminas de TMA para cada anticorpo com nível de diferença de pelo menos 40 cortes entre elas. Portanto, cada caso foi analisado em quatro *cores* de níveis diferentes para cada marcador. Acreditamos que desse modo, podemos analisar a expressão das proteínas em diferentes regiões do tumor, quase idênticas morfológicamente e com boa representatividade.

A série clínico-patológica do presente estudo representa bem o que a literatura retrata como característica de carcinomas epidermóides orais. Os dados são semelhantes aos da literatura em relação ao gênero e idade (HABER et al. 1998; KUNKEL et al. 2003; OLIVER et al. 2004; FILLIES et al. 2005), consumo de álcool e tabaco, localização do tumor primário e estadiamento dos tumores (KUNKEL et al. 2003; OLIVER et al. 2004; ECKERT et al. 2005).

A análise imunoistoquímica das proteínas transportadoras de glicose, GLUT-1 e GLUT-3 mostraram que os carcinomas epidermóides orais apresentam maior expressão da proteína GLUT-1 do que GLUT-3. Todos os casos foram positivos para GLUT-1 e estes dados são similares aos encontrados na literatura (FUKUMOTO et al. 1988; MELLANEN et al. 1994; KUNKEL et al. 2003; OLIVER et al. 2004).

O padrão de expressão de GLUT-1 mostrou um aspecto inusitado que foi a presença de coloração nuclear em 67 casos, sendo que em quatro deles foi exclusivamente localizada no núcleo. O padrão de membrana observado em 131/135 casos estudados é o esperado e o descrito na literatura (KUNKEL et al. 2003). Não encontramos trabalhos que demonstrassem padrão de marcação de GLUT-1 em núcleos. Esta marcação nuclear foi vista de forma constante e bem delimitada, como pode ser vista nas figuras do presente estudo. Não se pode desprezar a possibilidade de se tratar de um artefato, mas como pode ser observado nas figuras apresentadas e pela constância dos resultados nas duplicatas, tende-se a acreditar que a internalização para o núcleo do GLUT pode ocorrer.

A expressão de GLUT-3 ocorreu em 30 casos, todos de padrão membranoso e em apenas parte das células. Este resultado é mais difícil de se comparar com a literatura, pois são poucos os trabalhos que estudam GLUT-3 em tumores humanos. Todos os trabalhos mostram que em carcinomas a expressão de GLUT-3 é menos freqüente do que a de GLUT-1, mas as freqüências desta expressão variam amplamente de acordo com o sítio primário e entre os trabalhos científicos. Mesmo quando comparados a

quantidade de mRNA em carcinomas de cabeça e pescoço, houve maior quantidade de GLUT-1 do que de GLUT-3 (MELLANEN et al. 1994).

Em carcinomas laríngeos, BAER et al. (2002) encontraram maior frequência de positividade, em 30 casos positivos de 48 estudados. Índice alto foi também publicado por TIAN et al. (2004) que referem expressão de GLUT-3 em 16/19 carcinomas epidermóides de boca. Por outro lado, REISSER et al. (1999) não encontraram expressão de GLUT-3 em 40 biópsias de carcinomas de cabeça e pescoço. Resultado semelhante foi apresentado por HIGASHI et al. (1997), não encontraram caso positivo de GLUT-3 em 34 tumores de pâncreas. Cumpre realçar que estes autores trabalharam com anticorpos produzidos no próprio laboratório o que pode de alguma maneira justificar um potencial problema técnico. Uma porcentagem perto de 20% é bastante próxima da relatada por YOUNES et al. (1997), que encontraram 61/289 de carcinomas de não-pequenas células de pulmão. No mesmo tipo de tumor, MAROM et al. (2001) encontraram positividade para GLUT-3 em 56% dos casos. A situação parece ser diferente quando se trata de tumores astrocíticos, onde GLUT-3 é mais freqüente e em maior quantidade que GLUT-1 (NISHIOKA et al. 1992). O mesmo foi observado em casos de linfomas não-Hodgkin, onde GLUT-3 é preferencialmente expressa em relação a GLUT-1 (AYALA et al., dados não publicados).

A análise de associação entre a expressão de GLUT-1 e GLUT-3 e as características clínico-patológicas foram realizadas no presente estudo, enfatizamos as seguintes variáveis: gênero, consumo alcoólico, estadiamento clínico e embolização vascular. Dessa forma, foram verificadas

diferenças estatisticamente significativas da proteína GLUT-1 relacionada ao gênero dos pacientes. Quando analisadas de acordo com o padrão de expressão encontramos uma significância estatística ($p=0,017$) com GLUT-1 agrupado (M,M/N e N) e quando estratificado em número de células marcadas e padrão ($p=0,008$). De acordo com nossos resultados, o sexo masculino apresentou freqüentemente maior imunorreatividade para GLUT-1. Contudo, não existem dados na literatura que tenham relatado a existência dessa associação e que possam fornecer alguma explicação biológica para esse comportamento.

No presente estudo, foi-se observado casos positivos para a expressão protéica de GLUT-1 em todas as formas de classificação do padrão da sua expressão. Interessantemente, as formas mais homogêneas de marcação de membrana e nuclear mostraram serem mais freqüentes em pacientes que consumiam álcool. Embora, esses achados não encontrem reforços na literatura, é sabido que um dos fatores de risco para se desenvolver o câncer de cabeça e pescoço é o consumo de álcool e tabaco (NABER e WOLFE 2001).

A presença homogênea da imunorreatividade de GLUT-1 nesses casos citados acima mostrou que o número de células marcadas é mais importante do que a localização da expressão dessa proteína na célula, sugerindo mais uma vez a relação dela com a agressividade tumoral.

A existência da associação estatística significativamente positiva entre o consumo de álcool e sexo masculino ($p=0,0001$), em consonância com outro estudo (ANTUNES et al. 2003), confirmando os nossos próprios

resultados, onde o sexo masculino mostrou ser o maior fator de risco para expressão aberrante da proteína GLUT-1.

De acordo com a frequência, a proteína GLUT-1 apresentou uma associação estatística positiva em relação ao estadio clínico ($p=0,028$), onde mostrou uma marcação mais homogênea com o estadio avançado do tumor (III/IV). Tais achados encontram reforços na literatura em outros tipos de tumores (TOHAMA et al. 2005).

De acordo com nossos resultados, a expressão de GLUT-1 não mostrou associação estatística com a embolização vascular. Já a expressão da proteína GLUT-3 apresentou uma significância estatística com essa variável ($p=0,005$). Esses dados não encontram suporte na literatura.

No presente trabalho, a expressão de GLUT-3 se mostrou inversamente proporcional com o estadio clínico do tumor primário, onde em casos negativos para essa proteína foram mais freqüentes em tumores mais avançados (III/IV). Tais dados são consonantes com alguns trabalhos da literatura (BAER et al. 2002; YASUDA et al. 2005).

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a embolização vascular e o estadio clínico, onde apresentou uma maior proporção de invasão vascular presente nos casos mais avançados (III/IV). Tais dados não encontram apoio na literatura.

Não foi observada diferença significativa entre a expressão dos marcadores estudados nesse trabalho ($p=0,059$), concordante na literatura (MAROM et al. 2001). Apesar disso, foi observada uma tendência à significância estatística na associação entre GLUT-1 e GLUT-3 em relação à

ao número de células marcadas para GLUT-1, em casos positivos para GLUT-3 ocorreram com mais frequência em marcação mais homogênea de GLUT-1.

Não foi analisado o grau histológico desses tumores de CECP feitos TMA, pois se acredita não ser uma variável significativa para as correlações estatísticas com as características clínico-patológicas da neoplasia estudada.

Tem sido de grande interesse analisar a associação entre a expressão de GLUT-1 e o prognóstico em tumores humanos (BROWN et al. 1993; MENSCH et al. 2002). BARBER (1993) indicou que a elevada expressão de GLUT-1 pode ser um fator de pior prognóstico independente em câncer de cólon, similar com nossos achados em relação ao CECP oral.

Através de análises estatísticas de nossos dados, foi constatada uma associação estatisticamente significativa entre a expressão de GLUT-1 e GLUT-3 em relação à sobrevida global. Nossos resultados apresentaram uma menor sobrevida quando a expressão de GLUT-1 foi homogênea e presente na membrana e no núcleo das células, concordando com HABER et al. (1995), que usando tumores de colorretal, onde a expressão de GLUT-1 influenciou negativamente as curvas de sobrevida global, sugerindo a utilização desse marcador como indicador de pior prognóstico, porém, diferindo de outros autores (KUNKEL et al. 2003).

Em relação à análise estatística dos dados de GLUT-3, observamos que quando os pacientes apresentaram positividade para essa proteína, estavam associados com uma baixa sobrevida global, e também menor

sobrevida livre de doença, concordando com outros dados encontrados na literatura (BAER et al. 2002).

Um prévio estudo similar ao nosso em câncer de cérvix uterino, também demonstrou uma dissonância entre a expressão de GLUT-1 e sobrevida livre de doença encontrada em nossos resultados (AIRLEY et al. 2001), ou seja, não verificaram associação estatística entre eles. Já em KATO et al. (2002), encontramos achados que suportam nossos resultados, onde os casos positivos para GLUT-1 apresentaram pior sobrevida global.

Da mesma forma que os achados de OLIVER et al. (2004), nossos resultados encontraram relações significantes estatisticamente entre a expressão de GLUT-1 e a sobrevida global, mas não encontramos relação significativa com a sobrevida livre de doença.

Alguns estudos tentando entender o mecanismo metabólico dos tumores usaram similarmente ao nosso trabalho, marcadores de hipóxia, a qual diminuiu a resposta à quimioterapia (BERNIER et al. 2000). Estudos na literatura sugerem que a expressão de GLUT-1 em câncer CECP oral pode indicar a necessidade de quimioterapia neoadjuvante (NOGUCHI et al. 2000). Assim como a proteína GLUT-1 (um potencial marcador de hipóxia) a hipóxia tem sido demonstrada estar relacionada com progressão da doença em carcinoma de cérvix (HOCKEL et al. 1996).

Em relação à proteína GLUT-3, foi observada ter uma expressão mais restrita do que GLUT-1 em células malignas, concordando com outros autores (YOUNES et al. 1996; BAER et al. 2002) onde relataram que significativamente poucos tumores mostram expressão de GLUT-3.

Segundo OLIVER et al. (2004), a consistente presença da expressão de GLUT-1 nas camadas epiteliais escamosas normais demonstra que essa proteína é um indicador prognóstico ineficiente. Em nossos resultados, mostraram que em tumores da cavidade oral, a imunoexpressão de GLUT-1 ocorreu distante da camada epitelial normal, ou seja é mais superficial, sugerindo relação com diferenciação e processo de invasão do tumor, porém, quando a GLUT-1 está expressa no centro do tumor, distante dos vasos sanguíneos, suspeita-se da sua participação na indução da hipóxia do tumor.

Segundo nossos resultados, as expressões das proteínas GLUT-1 e GLUT-3 são indicadores significativos de prognóstico para óbito. Esses achados são semelhantes aos encontrados em estudos anteriores (YOUNES et al. 1996; KUNKEL et al. 2003; DE SCHUTTER et al. 2005), que demonstraram a presença de GLUT-3 em carcinoma de pulmão, mostrando uma associação com uma pior sobrevida, o que faz inferir que a expressão de GLUT-3 sugere a formação de novos e mais agressivos clones de células tumorais. Discordando, portanto, de outros autores que encontraram que a expressão dessa proteína, GLUT-1, não é significante fator prognóstico (BAER et al. 2002).

Quando avaliada a expressão imunoistoquímica de GLUT-1 e GLUT-3 em relação aos resultados clínicos dos pacientes com CECP oral, encontramos que em ambas as análises de sobrevida, tanto univariada quanto multivariada, a expressão de GLUT-1 e GLUT-3 foram fatores preditivos de baixa sobrevida, esse dado foi confirmado na literatura (BAER

et al. 2002) e também com estudos de outros tipos de tumores sólidos (JUAREZ et al. 1997; CHANG et al. 2000; KAWAMURA et al. 2001; KUNKEL et al. 2003).

Os achados nesse presente estudo surpreendem nossa prévia hipótese por indicar que em CECP oral a detecção da imunorreatividade de GLUT-3 tem mais sérias implicações em tumores no prognóstico do paciente do que a proteína GLUT-1, o que poderia ajudar num melhor tratamento para esses pacientes. Esse dado se assemelha com dados de outros estudos anteriores (BAER et al. 2002) que observaram a associação da expressão de GLUT-3 com pior prognóstico de pacientes com CECP.

A expressão de GLUT-3 se apresentou positiva predominantemente em tumores pouco diferenciados, sugerindo estar ligado à agressividade tumoral e confirmado no presente trabalho quando mostrou uma pior sobrevida. Tais resultados encontram respaldo na literatura (BAER et al. 2002; KUNKEL et al. 2003; TIAN et al. 2004).

Dois mecanismos podem explicar a ativação da expressão gênica de GLUT-1 em CECP oral e em outras neoplasias. Primeiro, a glicólise aumentada e a concomitante expressão protéica de GLUT-1 pode ser um quadro constitutivo do fenótipo maligno em muitos cânceres. Isso é consistente com observações feitas em estudos de transformação de cultura de células com oncogenes *RAS* ou *SRC*, por induzirem a captação aumentada de glicose e a expressão da proteína GLUT-1 (BIRNBAUM et al. 1987; FLIER et al. 1987). Segundo, o local da hipóxia no meio ambiente do tumor pode resultar em um aumento adaptativo no metabolismo glicolítico e

na expressão de GLUT-1 (HABER et al. 1998; CHEN et al. 2003). Essa última observação foi similar aos nossos achados, onde encontramos a expressão de GLUT-1 predominando na periferia de tumores bem/moderadamente diferenciados.

Em relação à expressão imunoistoquímica de GLUT-3, foi ausente em 78,9% dos casos aqui estudados. Interessantemente, observamos que a mortalidade para esses casos de tumores sem marcação de GLUT-3 foi maior que aqueles com positividade para essa proteína. Tais dados se assemelham com estudos na literatura (HABER et al. 1998; YOUNES et al. 1997; TIAN et al. 2004).

Na análise multivariada, apenas as variáveis: estadió clínico, embolização vascular e expressão positiva de GLUT-1 e GLUT-3 permaneceram como fatores prognósticos independentes. Adicionalmente, o risco relativo de recorrência para pacientes com estadió clínico avançado é 3,3 vezes maior que os pacientes com estadió clínico precoce ($p=0,006$).

Nos casos com expressão positiva na membrana e no núcleo de GLUT-1, o risco de morte é de 2,066 vezes maior do que para pacientes com expressão positiva só na membrana das células ($p=0,006$). Em relação ao risco de morte de pacientes com expressão positiva de GLUT-3 na membrana é de 1,933 vezes mais que em pacientes com ausência dessa expressão ($p=0,018$). Essa significância sugere a utilização dessas proteínas como potenciais valores preditivos para CECOP oral e também para outras neoplasias (HABER et al. 1998; FURUDO et al. 2001; YASUDA et al. 2005). Tem sido reportado recentemente que a expressão de GLUT-1 e/ou GLUT-

3, associa-se com pior prognóstico e com agressividade tumoral em carcinoma de pulmão, bexiga e CECp (YOUNES et al. 1997; BAER et al. 1997; JUAREZ et al. 1997). Segundo esses autores citados anteriormente, o aumento da extensão da intensidade, assim como a presença de positividade no núcleo das células nesses tumores, provavelmente reflete um grande aumento do metabolismo glicolítico em tumores malignos.

A embolização vascular presente nos casos estudados nesse trabalho, apresentou risco de morte de 2,165 vezes mais que em pacientes com ausência de invasão vascular ($p=0,003$). A expressão de GLUT-1 e GLUT-3 não apresentaram alguma associação estatisticamente significativa com outras variáveis como: raça, consumo de tabaco, sítio primário, número de linfonodos comprometidos, ruptura capsular e infiltração perineural, concordando com outros estudos em diferentes tipos de tumores (YASUDA et al. 2005; ECKERT et al. 2005).

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÕES

Visto que o presente trabalho usou 2 grupos distintos para casuística. Primeiramente, nos referiremos aos pacientes submetidos ao exame de Pet-Scan, concluímos que:

- 1) Há uma boa concordância entre a expressão imunoistoquímica de GLUT-1 e a detecção de tumores recidivados pelo Pet-Scan em carcinomas da cabeça e pescoço e do ovário;
- 2) O exame de Pet-Scan independe da expressão de GLUT-1 para a detecção de tumor, portanto, essa proteína não influencia na análise desse exame de imagem;
- 3) Aparentemente a expressão ou não da GLUT-3 não influencia na acurácia do exame de Pet -Scan em carcinomas da cabeça e pescoço e do ovário.

Posteriormente, através da análise da expressão das proteínas, GLUT-1 e GLUT-3, em CECP da boca pela técnica de imunoistoquímica analisadas nesse presente estudo, concluímos que:

- 1) A expressão imunoistoquímica de GLUT-1 é mais freqüente que a de GLUT-3 em carcinoma epidermóide da boca;
- 2) A presença da expressão de GLUT-1 nuclear se associa com o maior consumo de álcool e pior sobrevida global;
- 3) A expressão de GLUT-3 é fator preditivo de pior sobrevida livre de doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Airley R, Loncaster J, Davidson S, et al. Glucose transporter GLUT-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. **Clin Cancer Res** 2001; 7: 928-34.

Ak I, Stokkel MP, Pauwels EK. Positron emission tomography with 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose in oncology. Part II. The clinical value in detecting and staging primary tumours. **J Cancer Res Clin Oncol** 2000; 126:560-74.

Aloj L, Caracó C, Jagoda E, et al. GLUT-1 and hexokinase expression: relationship with 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake in A431 and T47D cells in culture. **Cancer Res** 1999; 59:4709-14.

Allred DC, Fuqua SA, Schiff R, et al. Estrogen receptor beta protein in human breast cancer: correlation with clinical tumor parameters. **Cancer Res** 2003; 63:2434-9.

Antunes AA, Takano JH, Queiroz TC, et al. Perfil Epidemiológico do Câncer Bucal no CEON/HUOC/UPE e HCP. **Odontologia Clín.-Científ.** 2003 2 (3): 181-186.

Baer SC, Casaubon L, Younes M, Expression of the human erythrocyte glucose transporte GLUT-1 in cutaneous neoplasia. **J Am Acad Dermatol** 1997; 37:575-7.

Baer S, Casaubon L, Schwartz MR, Macrogliese A, Younes M. GLUT-3 expression in biopsy specimens of laryngeal carcinoma is associated with poor survival. **Laryngoscope** 2002; 112:393-6.

Barber HR. Prophylaxis in ovarian cancer. **Cancer** 1993; 71(4 Suppl):1529-33.

Bernier J, Denekamp J, Rojas A, et al. ARCON: accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide in head and neck squamous cell carcinomas: The experience of the Cooperative Group of Radiotherapy of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Radiother Oncol** 2000; 55:111-9.

Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM, et al. Transformation of rat fibroblasts by FSV rapidly increases glucose transporter gene transcription. **Science** 1987; 235:1495-8.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral pharyngeal cancer. **Cancer Res** 1988; 48:3282-87.

Bondy C.A., Lee W.-H., Zhou J. Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression. **Mol Cell Neurosci** 1992; 3:305-14.

Brown RS, Wahl RL. Overexpression of GLUT-1 glucose transporter in human breast cancer: an immunohistochemical study. **Cancer** 1993; 72:2979-85.

Buck AK, Schirrmester H, Mattfeldt T, Reske SN. Biological characterization of breast cancer by means of PET. **Eur J Nucl Med Mol Imaging** 2004; 31:81s-7s.

Bustamante E, Morris HP, Peterson PL. Energy metabolism of tumor cells: Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. **J Biol Chem** 1981; 256:8699-704.

Cantuária G, Magalhaes A, Penalver M, et al. Expression of GLUT-1 glucose transporter in borderline and malignant epithelial tumors of the ovary. **Gynecol Oncol** 2000; 79:33-7.

Cantuária G, Fagotti A, Ferrandina G, et al. GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy. **Cancer** 2001; 92:1144-50.

Chang S, Lee S, Lee C, Kim JI, Kim Y. Expression of the human erythrocyte glucose transporter in transitional cell carcinoma of the bladder. **Urology** 2000; 55:448-52.

Chen J, Zhao S, Nakada K, et al. Dominant-negative hypoxia-inducible factor-1 reduces tumorigenicity of pancreatic cancer cells through the suppression of glucose metabolism. **Am J Pathol** 2003; 62:1283-91.

Cheon GJ, Chung JK, So Y, et al. Diagnostic accuracy of F-18 FDG-PET in the assessment of posttherapeutic recurrence of head and neck cancer. **Clin Positron Imaging** 1999; 4:2197-204.

Chung HH, Kim SK, Kim TH, et al. Clinical impact of FDG-PET imaging in post-therapy surveillance of uterine cervical cancer: from diagnosis to prognosis. **Gynecol Oncol** 2006; 103:165-70.

Cidad P, Almeida A, Bolanos JP. Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide rapidly stimulates cytoprotective GLUT3-mediated glucose uptake through 5'-AMP-activated protein kinase. **Biochem J** 2004; 384:629-36.

Chandler JD, Williams ED, Slavin JL, Best JD, Rogers S. Expression and localization of GLUT1 and GLUT12 in prostate carcinoma. **Cancer** 2003; 97:2035-42.

Cvetkovic D. Early events in ovarian oncogenesis. **Rep Biol Endocrinol Rev** 2003; 1:1-7.

De Schutter H, Landuyt W, Verbeken E, Goethals L, Hermans R, Nuyts S. The prognostic value of the hypoxia markers CA IX and GLUT 1 and the cytokines VEGF and IL 6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy +/- chemotherapy. **BMC Cancer** 2005; 5:42.

Dresel S, Grammerstorff J, Schwenzer K, et al. [18F]FDG imaging of head and neck tumours: comparison of hybrid PET and morphological methods. **Eur J Nucl Med Mol Imaging** 2003; 30:995-1003.

Eckert AW, Lautner MHW, Maurer P, Bilkenroth U, Hauptmann, Schubert J. Cancer Pathogenesis II: The prognostic value of GLUT-1 in oral squamous cell carcinomas. In: **IADR/AADR/CADR 83rd General Session**; 2005 March 9-12; Baltimore (USA); 2005.

Fillies T, Werkmeister R, Diest VP, Brandr B, Joos U, Buerger H. HIFI-alpha overexpression indicates good prognosis in early stage squamous cell carcinoma of the oral floor. **BMC Cancer** 2005; 5:1-9.

Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF. Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. **Science** 1987; 235:1492-5.

Fukumoto H, Seino S, Imura H, et al. Characterization and expression human HepG2/ erythrocyte glucose transporter gene. **Diabetes** 1988; 37:657-61.

Furudoi A, Tanaka S, Haruma K, et al. Clinical significance of human erythrocyte glucose transporter 1 expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. **Oncology** 2001; 60:162-9.

Garzetti GG, Ciavattini A, Goteri G, et al. The combined evaluation of p53 accumulation and Ki 67 (MIBI) labelling index provides independent information on overall survival of ovarian carcinoma patients. **Ann Oncol** 1997; 8:469-76.

Gjedde A. Glucose metabolism. In: Wagner H, editor. **Principles and practice of nuclear medicine**. 2th ed. Philadelphia: W B Saunders; 1995. p.56-62.

Goldfischer M, Weiser K, Pritsker A. GLUT-1 glucose transporter expression in ovarian neoplasms; a marker of tumor progression [abstract]. **Lab Invest** 1996; 74:90 A.

Goerres GW, Mosna-Firlejczyk K, Steurer J, von Schulthess GK, Bachmann LM. Assessment of clinical utility of 18F-FDG PET in patients with head and neck cancer: a probability analysis. **Eur J Nucl Med Mol Imaging** 2003; 30:562-71.

Goshen E, Yahalom R, Talmi YP, Rotenberg G, Oksman Y, Zwas ST. The role of gamma-PET in the evaluation of patients with recurrent squamous cell cancer of the head and neck. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2005; 34:386-90.

Haber RS, Rathan A, Weiser KR, et al. FDG uptake, tumor proliferation and expression of glycolysis associated genes in animal tumors models. **Nucl Med Biol** 1992; 21:827-34.

Haber RS, Wilson CM, Weinstein SP, Pritsker A, Cushman SW. Thyroid hormone increases the partitioning of glucose transporters to the plasma membrane in ARL 15 cells. **Am J Physiol** 1995; 269:E605-10.

Haber R, Rathan A, Weiser KR, et al. GLUT-1 Glucose transporter Expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. **Cancer** 1998; 17:34-40.

Haberkorn U, Strauss LG, Reisser C, et al. Glucose uptake, perfusion, and cell proliferation in head and neck tumors: relation of positron emission tomography to flow cytometry. **J Nucl Med** 1991; 32:1548-55.

Hashiramoto M, Clark AE, Mori H, Muraoka A, et al. Site-directed mutagenesis of Glut 1 in helix 7 residue 282 results in perturbation of exofacial ligand binding. **J Biol Chem** 1992; 267:17502-7.

Heber D, Byerley LD, Tchekmedyian NS. Hormonal and metabolic abnormalities in the mal nourished cancer patients: effects on host-tumor interaction. **J. PEN J Parenter Enteral Nutr** 1992; 16:60s-4s.

Higashi T, Tamaki N, Honda T, et al. Expression of glucose transporters in human pancreatic tumors compared with increased FDG accumulation in PET study. **J Nucl Med** 1997; 38:1337-44.

Higashi K, Ueda Y, Sakurai A, et al. Correlation of GLUT-1 glucose transporter expression with [18F]FDG uptake in non-small cell lung cancer. **Eur J Nucl Med** 2000; 27:1778-85.

Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. **Cancer Res** 1996; 56:4509-15.

Hubner K, McDonald TW, Neithammer JG, Smith GT, Gould HR, Bounocore E. Assessment of primary and metastatic ovarian cancer by positron emission tomography (PET) using 2-[18F]Deoxyglucose)2-[18F]FDG. **Gynecol Oncol** 1993; 51:197-204.

Ido T, Wan C-N, Casella V, Fowler JS, et al. Labeled 2-deoxy-D-glucose analogues ^{18}F - labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose, and ^{14}C -2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. **J Labelled Compds Radiopharm** 1993; 32:328-9.

Idrees MT, Schlosshauer P, Li G, Burstein DE. GLUT1 and p63 expression in endometrial intraepithelial and uterine serous papillary carcinoma. **Histopathology** 2006; 49:75-81.

Iserovich P, Wang D, Ma L, et al. Changes in glucose transport and water permeability resulting from the T310I pathogenic mutation in Glut1 are consistent with two transport channels per monomer. **J Biol Chem** 2002; 277:30991-7.

Ito T, Noguchi Y, Satoh S, Hayashi H, Inayama Y, Kitamura H. Expression of facilitative glucose transporter isoforms in lung carcinomas: Its relation to histologic type, differentiation grade, and tumor stage. **Mod Pathol** 1998; 11:437-43.

Juarez D, Lechago LV, Somoano J, Younes M. Glut1 expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder correlates with aggressive biologic behavior [abstract]. **Lab Invest** 1997; 74:75A.

Kalir T, Wang BY, Goldfischer M, et al. Immunohistochemical staining of GLUT1 in benign, borderline, and malignant ovarian epithelia. **Cancer** 2002; 94:1078-82.

Kalir T, Rahaman J, Hagopian G, Demopoulos R, Cohen C, Burstein DE. Immunohistochemical detection of glucose transporter GLUT-1 in benign and malignant fallopian tube epithelia, with comparison to ovarian carcinomas. **Arch Pathol Lab Med** 2005; 129:651-4.

Kallinowski E, Schienger KH, Kunkel S, et al. Blood flow, metabolism, cellular microenvironment and growth rate of human tumor xenography **Cancer Res** 1989; 49:3759-64.

Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. **Hum Mol Genet** 2001; 10:657-62.

Kang SS, Chun YK, Hur MH, et al. Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. **Jpn J Cancer Res** 2002; 93:1123-8.

Kato H, Takita J, Miyazaki T, et al. GLUT-1 glucose transport expression in esophageal squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness. **Anticancer Res** 2002, 22, 2635-9.

Kawamura T, Kusakabe T, Sugino T, et al. Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma. **Cancer** 2001; 92:634–41.

Kayuno T, Fukumoto H, Eddy RL, et al. Evidence for a family of human glucose transporter-like protein; sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. **J Biol Chem** 1998; 263:15245-8.

Kim WS, Kim YY, Jang SJ, Kimm K, Jung MH. Glucose transporter 1 (GLUT1) expression is associated with intestinal type of gastric carcinoma. **J Korean Med Sci**. 2000; 15:420-4.

Klepper J, Vera JC, De Vivo DC. Deficient transport of dehydroascorbic acid in the glucose transporter protein syndrome. **Ann Neurol** 1998; 44:286-7.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4: 844-7.

Kubota R, Yamada S, Kubota K, Ishiwata K, Tamahashi N, Ido T. Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography. **J Nucl Med** 1992; 33:1972-80.

Kunkel M, Reichert TE, Benz P, et al. Overexpression of GLUT-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. **Cancer** 2003; 15:1015-24.

Kurokawa T, Yoshida Y, Kawahara K, et al. Expression of GLUT-1 glucose transfer, cellular proliferation activity and grade of tumor correlate with [F-18]-fluorodeoxyglucose uptake by positron emission tomography in epithelial tumors of the ovary. **Int J Cancer** 2004; 109:926-32.

Lange K. Role of microvillar cell surfaces in the regulation of glucose uptake and organization of energy metabolism. **Am J Physiol Cell Physiol** 2002; 282:C1-26.

Lapela M, Eitgtved A, Jykkio S, et al. Experience in qualitative and quantitative FDG PET in follow-up of patients with suspect recurrence from head and neck cancer. **Eur J Cancer** 2000; 36:856-67.

Latorre MRDO, Franco EL. Epidemiologia de câncer do ovário. In: Abrão FS, Abrão MS, editores. **Câncer do ovário**. São Paulo: Roca; 1997. p.51-63.

Lowe VJ, Boyd JH, Dunphy FR, et al. Surveillance for recurrent head and neck cancer using positron emission tomography. **J Clin Oncol** 2000; 18:651-8.

Maher F, Vannucci S, Takeda J, Simpson IA. Expression of mouse GLUT3 and human GLUT3 glucose transporter in brain. **Biochem Biophys Res Commun** 1992; 182:703-11.

Marom EM, Aloia TA, Moore MB, et al. Correlation of FDG PET imaging with GLUT-1 and GLUT-3 expression in early-stage non-small cell lung cancer. **Lung Cancer** 2001; 33:99-107.

Martin PM, Brown JB. The effect of intrauterine contraceptive devices on ovarian and menstrual function in the human. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 36:1125-31.

Mellanen P, Minn H, Grenman R, Harkonen P. Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. **Int J Cancer** 1994; 56:622-9.

Mensch LS, Weller L, Simmons-Arnold L, Gibson PC, Leiman G, Beatty B. GLUT1 antibody staining in thin-layer specimens of benign and malignant body cavity effusions. **Acta Cytol** 2002; 46:813-8.

Ministério da Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Estimativa/2006: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? **Adv Anat Pathol** 2001; 8:14-20.

Mochizuki T, Tsukamoto E, Kuge Y, et al. FDG uptake and glucose transporter subtype expressions in experimental tumor and inflammation models. **J Nucl Med** 2001; 42:1551-5.

Mucci NR, Akdas G, Manely S, Rubin MA. Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. **Hum Pathol** 2000; 31:406-14.

Mueckler M. Facilitative glucose transporters. **Eur J Biochem** 1994; 219:713-25.

Naber SR, Wolfe HJ. Molecular biology and Genetic of head and neck tumors. In: Gnepp D, editor. **Diagnostic surgical pathology of head and neck**. Philadelphia: W B Saunders; 2001. p.857-66.

Nagamatsu S, Kornhauser JM, Berant CF, Susumu S, Mayo KE, Bell GI. Glucose transporter expression in brain: cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. **J Biol Chem** 1992; 267:467-72.

Nelson CA, Wang JQ, Leav I, Crane PD. The interaction among glucose transport, hexokinase, and glucocse-6-phosphatase with respect 3H-2-deoxyglucose retention in murine tumor models. **Nucl Med Biol** 1996; 23:522-41.

Nishioka T, Oda Y, Seino Y, et al. Distribution of the glucose transporters in human brain tumors. **Cancer Res.** 1992; 52:3972-9.

Noguchi Y, Okamoto T, Marat D, et al. Expression of facilitative glucose transporter 1 mRNA in colon cancer was not regulated by K-ras. **Cancer Lett** 2000; 154:137-42.

Oliver RJ, Woodward RTN, Sloan P, Thakker NS, Strtford IJ, Airley RE. prognostic value of facilitative glucose transporter GLUT-1 In oral squamous cell carcinoma treated by surgical resection: results of Eortc Translational Research Fund Studies. **Eur J Cancer** 2003; 13:503-7.

Oliver RJ, Woodward RT, Sloan P, Thakker NS, Stratford IJ, Airley RE. Prognostic value of facilitative glucose transporter GLUT-1 in oral squamous cell carcinomas treated by surgical resection; results of EORTC Translational Research Fund studies. **Eur J Cancer** 2004; 40:503-7.

Ozcan A, Deveci MS, Oztas E, et al. Prognostic value of GLUT-1 expression in ovarian surface epithelial tumors: a morphometric study. **Anal Quant Cytol Histol** 2005; 27:181-6.

Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. **J Biol Chem** 1990; 265:18035-40.

Reisser C, Eichhorn K, Herold-Mende C, Born AI, Bannasch P. Expression of facilitative glucose transport proteins during development of squamous cell carcinomas of the head and neck. **Int J Cancer** 1999; 80:194-8.

Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. **Exp Mol Pathol** 2001; 70:255-64.

Rudlowski C, Moser M, Becker AJ, et al. GLUT1 mRNA and protein expression in ovarian borderline tumors and cancer. **Oncology** 2004; 66:404-10.

Schmidt M, Schmalenbach M, Jungehunsing M, et al. F18-Fdg Pet for detecting recurrent head and neck cancer, local lymph node involvement and distant metastases. **Nuklearmedizin** 2004, 43:91-101.

Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. **Methods Mol Med**. 2005; 114:257-68.

Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, et al. Translocation of the glucose transporter Glut 4 in cardiac myocytes of the rat. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88:7815-9.

Stokkel MP, Linthorst MF, Borm JJ, Taminiau AH, Pauwels EK. A reassessment of bone scintigraphy and commonly tested pretreatment biochemical parameters in newly diagnosed osteosarcoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2002; 128:393-9.

Stuart Wood I, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **Br J Nutr** 2003; 89:3-9.

Tian M, Zhang H, Nakasone Y, Mogi K, Endo K. Expression of GLUT-1 and GLUT-3 in untreated oral squamous cell carcinoma compared with FDG accumulation in a PET study. **Eur J Nucl Med Mol Imag** 2004; 31:5-12.

Tohama T, Okazumi S, Makino H, et al. Overexpression of glucose transporter 1 in esophageal squamous cell carcinomas: a marker for poor prognosis. **Dis Esophagus** 2005; 18:185-9.

Wang J, Kobayashi M, Han M, et al. MyD88 is involved in the signalling pathway for Taxol-induced apoptosis and TNF-alpha expression in human myelomonocytic cells. **Br J Haematol** 2002; 118:638-45.

Yamada S, Kubota K, Kubota R, et al. High accumulation of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in turpentine-induced inflammatory tissue. **J Nucl Med** 1995; 36:1301-6.

Yasuda M, Naoki O, Hayashi H, et al. Glucose transporter-1 expression in the thyroid gland: clinicopathological significance for papillary carcinoma. **Oncol Rep** 2005; 14:1499-504.

Yoder LH. The epidemiology of ovarian cancer: a review. **Oncol Nurs Forum** 1990; 17:411-5.

Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporters in human cancers. **Cancer Res** 1996; 56:1164-7.

Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J. Immunohistochemical detection of GLUT-3 in human tumor and normal tissues. **Anticancer Res** 1997; 17:2747-50.

Zhao S, Kuge Y, Mochizuki T, et al. Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in 18F-FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor. **J Nucl Med** 2005; 46:675-8.

ANEXOS

Anexo 1 - Ficha de levantamento de prontuários

Fundação Antônio Prudente – Hospital A. C. Camargo

Critérios de Inclusão

Sem tratamento prévio
Carcinoma Epidermóide
Língua oral , gengiva superior , gengiva inferior, soalho bucal, palato duro, região jugal, sulcos bulco-alveolares, área retromolar
Qualquer T e qualquer N
Cirurgia como tratamento inicial

Critérios de Exclusão

Tratamento prévio
Outros tumores de CP previamente
Tumores múltiplos simultâneos
Outras histologias ou sem AP
M1
RT ou QT prévias

IDENTIFICAÇÃO E DADOS DEMÓGRAFICOS

1. Número do estudo: [][][][]
2. RGH: [][][][][]
3. Idade: anos [][][]
4. Sexo: (1) Masculino (2) Feminino []
5. Raça: (1) Branca (2) Amarela (3) Negra (4) Outra []
6. Residência: (1) Capital (2) Outra cidade de São Paulo (3) Outro estado []

HISTÓRIA CLÍNICA

7. Tempo de história: meses (999 se desconhecido) []
8. Queixas: (1) Somente do tumor primário (2) Somente metástase (3) Ambos (9) Desconhecido ... []
9. Biópsia prévia: (0) Não (1) Primário (2) Linfonodo (3) Ambos []
10. História familiar de câncer: (0) Não (1) Pais (2) Irmãos (3) Outros parentes (9) Desconh. [][][]
11. Tabagismo: (0) Não (1) + (2) ++ (3) +++ (4) ++++ (9) Desconhecido []
12. Etilismo: (0) Não (1) + (2) ++ (3) +++ (4) ++++ (9) Desconhecido []

LOCO-REGIONAL

13. Local do tumor: (1) ponta de língua (2) corpo de língua (3) ponta e corpo de língua (4) sulco pelve-lingual (5) soalho (6) gengiva inferior (7) retromolar []
14. Extensão do tumor: (0) Não (1) língua (2) soalho (3) gengiva (4) retromolar (5) lábio (6) jugal (7) palato (8) loja amígd [][][][]
15. Linha média: (1) distal >1cm (2) distal <1cm (3) chega (4) ultrap. <1cm (5) ultrap. >1cm ... []
16. Tipo de lesão: (1) Úlcero-vegetante (2) Úlcero-infiltrativa (3) Outra []
17. Diâmetro da aproximado da lesão: cm [][]
18. Níveis de linfonodos ipislat. N+ clinicamente: (0) Não (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V [][][][][]
19. Diâmetro do maior linfonodo ipislat. +: cm (0) se N- [][]
20. Níveis de linfonodos contralat. N+ clinical.: (0) Não (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V [][][][][]
21. Diâmetro do maior linfonodo contralat. +: cm (0) se N- [][]
22. Mobilidade dos linfonodos: (1) Móveis (2) diminuição da mobil. (3) fixação superf. (4) []
23. Estádio T (atualizar UICC 87): (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9) Tx []
24. Estádio N (atualizar UICC 87): (0) No (1) N1 (2) N2a (3) N2b (4) N2c (5) N3 (9) Nx []

fixação prof.

CIRURGIA

25. Data da cirurgia: ____/____/____ [][][][]
26. Cirurgia tumor primário: (1) Glossectomia parc. (2) Hemiglossect. (3) Pelveglossect. (4) Pelve(gl.)mand. marg. – Pull

- (5) Pelve(gl.)mand. sec. – Com. (6) Retrom. (7) Retrom. Ampliada...[]
27. Esvaz. cervical ipislat.: (0) Não (1) ESOH (2) ECR (3) ECRM(XI) (4) ECRM (XI+VJ)[]
28. Esvaz. cervical contral. (simult.): (0) Não (1) ESOH (2) ECR (3) ECRM(XI) (4) ECRM (XI+VJ) []
29. Esvaz. Cervical: (0) Não (1) Monobloco (2) Dibloco[]
30. Ampliação do esvaz. Cervical: (0) Não (1) pele (2) carótida (3) hipoglosso (4) vago (5) Outros[][][]
31. Reconstrução: (0) Não (1) língua (2) outro retalho local (3) Mc Gregor-frontal (4) Backanjan- deltop. (5) mioc. peitoral maior (6) mioc. peitoral menor (7) outro miocut. (8) microcirúrgico[][]
32. Complicações imediatas: (0) Não (1) infecção (2) necrose de retalhos (3) fistula oro-cerv. (4) ruptura da carótida (5) fistula quilosa (6) infecção resp. (7) outra[][][]
33. Data da alta hospitalar: ____/____/____[][][]

RADIOTERAPIA PÓS-OPERATÓRIA

34. Data de início: ____/____/____ (0/0/0 se não fez)[][][]
35. Aparelho: (0) Não fez (1)Ortov. (2) Cesium (3) Cobalto (4) Al[]
36. Dose do campo cervico-facial: _____ Gy (0 se não fez)[][]
37. Dose em fossa ipislat.: _____ Gy (0 se não fez)[][]
38. Dose em fossa contralat.: _____ Gy (0 se não fez)[][]
39. Data do final: ____/____/____ (0/0/0 se não fez)[][][]

ANATOMOPATOLÓGICO DA PEÇA DA CIRURGIA INICIAL

40. Número do AP: [][][][][][][]
41. Histologia do primário: (1) CEC I (2) CEC II (3) CEC III (4) CEC SOE (5) CA indef.[]
42. Embolização vascular: (0) Não (1) linfática (2) sangüínea (3) ambas (4) “presente” (9) Ign.[]
43. Infiltração perineural: (0) Não (1) presente (9) ignorado[]
44. Margens: (0) livres (1) próximas (< 0,5 cm) (2) comprometidas (9) ign.[]
45. Espessura: _____ mm (999 se não relatado)[]
46. Número de linfonodos comprometidos ipislat. : _____ (99 se não esvaziado)[]
47. Número de linfonodos dissecados ipislat. : _____ (99 se não esvaziado) ..[][][]
48. Nível de linfonodos comprom. ipislat. : (0) N- (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V (9) ign./não esv.....[][][][][]
49. Número de linfonodos comp. contral.: _____ mm (99 se não esv.)[]
50. Número de linfonodos dissecados contralat.: _____ mm (999 se não esv.)[][][]
51. Nível de linfonodos comprom. contralatet. : (0) N- (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V (9) ign./não esv.[][][][][]

EVOLUÇÃO

52. Data da primeira recidiva: ____/____/____ (0/0/0 se não fez)[] [] []
53. Locais de recidiva: (0) não teve (1) local (2) pescoço ipsi. (3) pescoço contra. (4) pulmão (5) osso (6) fígado (7) outras distâncias _____ (8) recidiva, local ign. (9) ignorado- perdido de vista assintomático < 5 anos [] [] [] [] []
54. Data de diagnóstico do segundo tumor primário: ____/____/____ (0/0/0 se não fez)[] [] []
55. Local do segundo tumor primário: CID-0 _____ (0 se não teve).... [] [] [] [] []
56. Data da última informação objetiva de segmento: ____/____/____[] [] []
57. Status: (1) Vivo s/ doença (2) Vivo com doença (3) Morte pós-op (4) MOCA (5) Óbito p/ out/causas _____ (6) Perdido de vista (definição: Para pacientes com menos de 5 anos de seguimento todos os que deixaram de retornar por um período igual ao dobro estipulado. Pacientes assintomáticos perdidos após 5 anos devem ser classificados como Vivos 000)[]

Para pacientes perdidos de vista: Anotar nome, endereço e telefone.

Entregar o prontuário aos responsáveis pela convocação de pacientes desta lista, diariamente.

Coletador de Dados:

Fonte: Kowaski (1996)

Anexo 2 – Método para realização da técnica de imunoistoquímica.

Fonte: Hospital do Câncer A C Camargo

Em todos os casos, inicialmente, foi feita a desparafinização dos cortes de 3µm de espessura em três banhos de xilol, por 5 minutos cada, seguido por quatro passagens em etanol 100%, 95%, 80% e 70%, por 30 segundos, em temperatura ambiente.

Recuperação antigênica:

1. Lavar em água corrente, por 5 minutos.
2. Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 10 vol), com 3 trocas de 5 minutos cada.
3. Lavar em água corrente, por 5 minutos.
4. Bloqueio das proteínas:
 - GLUT-1 E GLUT-3- bloqueador de proteína Preotein Block Serum-Free (DAKO, X0909,Denmark)
5. Incubação das lâminas com o anticorpo primário diluído em diluente (DAKO, GLUT-1 and Lab Vison Corporation- GLUT-3), em título pré-estabelecido, por 2 horas, em temperatura ambiente.
 - GLUT-1- 1:500, título padronizado no próprio laboratório.
 - GLUT-3- 1:400, título padronizado no próprio laboratório.
6. Lavagem individual das lâminas, com tampão PBS, seguida por 3 trocas do mesmo tampão, de 5 minutos cada.
7. Incubação com o anticorpo secundário biotinilado:
8. Lavagem individual das lâminas, com tampão PBS, seguida por 3 trocas do mesmo tampão, de 5 minutos cada.
9. Incubação com o complexo streptavidina-biotina peroxidase:
 - GLUT-1 E GLUT-3- Kit LSAB+ peroxidase (DAKO, K0690, Denmark), em temperatura ambiente, por 20 minutos.
10. Lavagem individual das lâminas, com tampão PBS, seguida por 3 trocas do mesmo tampão, de 5 minutos cada.

11. Incubar as lâminas em solução de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride do kit Liquid DAB + Substrate (DAKO, K3468, Denmark) diluído 1:50, em temperatura ambiente, por 5 minutos.
12. Lavagem em água corrente, por 5 minutos.
13. Contracorar com Hematoxilina de Harris, por 2 minutos e diferenciar imergindo 2 vezes em solução contendo água e ácido clorídrico ou água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 9,5%), seguida por lavagem em água corrente, por 5 minutos.
14. Desidratação das lâminas em etanol 80, 95 e 100% e xilol, em passagens sucessivas.
15. Montagem das lâminas em Entellan neu (MERCK, 1.07961, Germany).

As reações sempre foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado e dois controles negativos. O primeiro deles foi realizado pelo não uso do anticorpo primário e o segundo, através da retirada do anticorpo secundário durante os passos da reação.

Os anticorpos primários utilizados foram contra GLUT-1 e GLUT-3, ambos comerciais. O anticorpo contra GLUT-1 utilizado foi o de fabricação da DAKO (Carpinteria, USA). O anticorpo utilizado é policlonal MYM contra a proteína GLUT-1 (Dako Cytomation®). A reatividade desse anticorpo é positivamente controlada pela expressão na membrana celular de eritrócitos em tecidos normais e neoplásicos os quais foram usados como controles internos positivos. A proteína GLUT-1 tem sido localizada em microvasos do cérebro, trofoblastos placentais, túbulos renais e células do centro germinativo em tecido linfóide reativo.

Para a proteína GLUT-3 se utilizou o anticorpo policlonal (Lab Vision Corporation), produzido a partir de peptídeo sintético da porção terminal-C da proteína. Como controle positivo foram usados cortes de placenta e testículo, respectivamente. Este anticorpo é detectável em poucas células normais do tipo espermatídes em testículos com espermatogênese ativa, membrana de trofoblastos placentar e neurônios. GLUT-3 também é detectável em cânceres humanos, incluindo ovário, pulmão e testículos. Para validar as reações imunoistoquímicas utilizamos como controles internos positivos as células inflamatórias adjacentes ao tumor.