FLAVIA SIROTHEAU CORREA PONTES

**Avaliação *in vitro* da expressão das proteínas
PTEN, Akt, Mdm2 e p53 em células de
carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
submetidas a ação de EGF e 17-AAG**

São Paulo

2007

Flávia Sirotheau Corrêa Pontes

Avaliação *in vitro* da expressão das proteínas PTEN, Akt, Mdm2 e p53 em células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço submetidas a ação de EGF e 17-AAG

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior

São Paulo

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pontes FSC. Avaliação *in vitro* da expressão das proteínas PTEN, Akt, Mdm2 e p53 em células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço submetidas a ação de EGF e 17-AAG [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo,/...../.....

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a)_____

Titulação:_____

Julgamento: _____Assinatura:

2) Prof(a). Dr(a)_____

Titulação:_____

Julgamento: _____Assinatura:

3) Prof(a). Dr(a)_____

Titulação:_____

Julgamento: _____Assinatura:

4) Prof(a). Dr(a)_____

Titulação:_____

Julgamento: _____Assinatura:

5) Prof(a). Dr(a)_____

Titulação:_____

Julgamento: _____Assinatura:

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus dois amores:
meu marido Helder, a outra metade da minha alma e a
minha filha Ana Luísa, a razão da minha vida.*

*Meus queridos pais,
Edilberto e Sônia.*

*Minha eterna gratidão e agradecimento
aos meus grandes amigos, companheiros e
incentivadores. Meus anjos de luz.*

"Não ache, faça um experimento."

Sir John Hunter

AGRADECIMENTO ESPECIAL

O que um discípulo poderia dizer a um mestre que, ao mesmo tempo, fosse também um grande amigo?

Ao mestre, eu diria que vã é a palavra do mestre que não impregna o discípulo com seu saber, pois nada se ganha no estudo quando ele não varre da mente do aprendiz as dúvidas que tinha antes de iniciá-lo. E você, Décio, como um mestre digno de ostentar tal nome, soube guiar-me, soube conduzir-me ao encontro do saber, em uma caminhada árdua, é bem verdade, mas prazerosa, porque os frutos colhidos recompensaram-me as lucubrações.

Ao amigo, eu diria que foi um ser múltiplo: ora um irmão mais velho, generoso e companheiro, ora um pai, exigente, mas compreensivo, ora um colega, ético e sempre disponível, enfim, um verdadeiro amigo.

Por isso, nestas breves, mas sinceras palavras, o penhor de minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Prof^a. Dra. Suzana C.O.M. Sousa uma pesquisadora dedicada, uma professora responsável, mãe presente e amorosa. Meu exemplo de conciliação entre a vida profissional e a vida familiar. Obrigada pelas palavras de carinho e incentivo.

Prof. Dr. Fabio D. Nunes um modelo de pesquisador. Minha eterna gratidão pelos ensinamentos e pela convivência fraternal.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: Prof^a. Dra. Marina Magalhães, Prof^a. Dra. Marília Martins, Prof^a. Dra. Andréa Mantesso e Prof^a. Dra. Karem Ortega, meus mais sinceros agradecimentos pelo ensinamentos e incentivo.

Aos funcionários da FOUSP que sempre com amizade e carinho me ajudaram a superar os obstáculos do cotidiano: Edna Todai (*in memorian*), Elisa Santos, Nair Pereira, Néia Barbosa a Leonel, Zilda Alves e Beatriz Costa.

Aos meus queridos colegas de Pós-Graduação, com quem dividimos nossos sucessos e frustrações, alegrias e cansaço. Agradeço a vocês pelos momentos em que passamos juntos: Flávia Caló, Camila Rodinni, Tatiana Libório, Fernanda Yamamoto, Tessa, Kívia Linhares, Patrícia Adachi, Márcia Campos, Thais Acquafreda, Marina Moura, Yonara, Juliana, Renata, Alexandra, Fábio Coracin, Brunno, Paulo Sérgio, Paulo Braz, Alexandre Fraige, Alexandre.

Agradeço ainda aos meus grandes amigos Sérgio e Dorotéia Cury que se revelaram verdadeiros companheiros, um casal que tem minha admiração por serem pessoas maravilhosas e de bom coração.

Agradeço ainda a outro amigo especial, Marcos Squadrans, pela confiança e apoio em todas às horas.

RESUMO

PONTES FSC. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PTEN, AKT, MDM2 E P53 EM CÉLULAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO SUBMETIDAS A AÇÃO DE EGF E 17-AAG [TESE DE DOUTORADO]. SÃO PAULO: FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA USP; 2007.

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é responsável por 90% das neoplasias malignas, nesta região. Molecularmente, inúmeras vias de sinalização, ainda não muito bem compreendidas, são responsáveis pelo seu crescimento e invasão para tecidos vizinhos, além de metástases para órgãos distantes. Este trabalho destinou-se a avaliar o *crosstalk* entre as vias de sinalização do PTEN, Akt, Mdm2 e p53 em quatro linhagens de células de carcinoma epidermóide (HN6, HN19, HN30 e HN31) e queratinócitos imortalizados (HaCat), estimulados com EGF (fator de crescimento epitelial) e 17-AAG. Para observar a localização e os níveis de PTEN, Akt, Mdm2 e p53 nos diferentes compartimentos celulares estas proteínas foram localizadas e quantificadas no interior celular através das técnicas de imunofluorescência e western blot, respectivamente. Os resultados mostraram que a ativação da via do PI3K/Akt, pelo EGF, promoveu a proliferação celular, sendo HN31 a linhagem celular de melhor resposta proliferativa. Quando as células foram tratadas com 17-AAG a linhagem HN31 foi a que melhor traçou um perfil apoptótico com diminuição dos níveis de Akt, ausência de Mdm2 e aumento dos níveis de PTEN e p53. As linhagens celulares HN6 e HN19 continuaram apresentando níveis significativos de Akt e Mdm2, o que sugere um potencial

mais agressivo devido a manutenção do comportamento proliferativo e anti-apoptótico destas linhagens.

Palavras-Chave: carcinoma epidermóide, Akt, p53, Mdm2, PTEN, 17-AAG e EGF.

Pontes FSC. Avaliação *in vitro* da expressão das proteínas PTEN, Akt, Mdm2 e p53 em células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço submetidas a ação de EGF e 17-AAG [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) represents 90% of all head and neck malignancies. Cancer growth, invasion and metastasis are due to several signaling pathways that, unfortunately, are not completely understood. The aim of this study was the crosstalk evaluation among PTEN, Akt, Mdm2 and p53 signaling pathways in four different HNSCC cell lines (HN6, HN19, HN30 and HN31) and HaCat cell line (immortalized keratinocytes), all of them treated with 10ng/ml EGF (epidermal growth factor) and 2 μ M 17-AAG. Western blot and immunofluorescence were performed in order to analyze PI3K/Akt signaling key target proteins: PTEN, Akt, Mdm2 and p53. Treatment of HNSCC cell lines with EGF resulted in activation of the PI3K/Akt pathway and enhanced cell proliferation. The results showed higher proliferative activity in HN31 cell line. The treatment of HNSCC cell lines with 17-AAG inhibited the proliferation in various levels. HN31 cell lines expressed PTEN and p53 in high levels and low expression for Akt and Mdm2 proteins. These findings suggest that 17-AAG can induce p53-dependent apoptosis in HN31 cell lines. On the contrary, HN6 and HN19 cell lines displayed high levels of Akt and Mdm2 proteins, resulting in decreased apoptosis and increased aggressive potential.

Keywords: HNSCC, Akt, p53, Mdm2, PTEN, 17-AAG and EGF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 – Resultados em imunofluorescência da proteína PTEN nos grupos controle, EGF e 17-AAG.....	64
Figura 5.2 – Resultados de Western blot das proteínas Akt, PTEN, Mdm2 e p53 nos grupos controle, EGF e 17-AAG na linhagem HaCat.....	65
Figura 5.3 – Resultados de Western blot das proteínas Akt, PTEN, Mdm2 e p53 nos grupos controle, EGF e 17-AAG na linhagem HN6.....	65
Figura 5.4 – Resultados de Western blot das proteínas Akt, PTEN, Mdm2 e p53 nos grupos controle, EGF e 17-AAG na linhagem HN30.....	66
Figura 5.5 – Resultados de Western blot das proteínas Akt, PTEN, Mdm2 e p53 nos grupos controle, EGF e 17-AAG na linhagem HN19.....	66
Figura 5.6 – Resultados de Western blot das proteínas Akt, PTEN, Mdm2 e p53 nos grupos controle, EGF e 17-AAG na linhagem HN31.....	67
Figura 5.7 – Resultados em imunofluorescência da proteína p53 nos grupos controle, EGF e 17-AAG.....	68
Figura 5.8 – Resultados em imunofluorescência da proteína Mdm2 nos grupos controle, EGF e 17-AAG.....	69
Figura 5.9 – Resultados em imunofluorescência da proteína Akt nos grupos controle, EGF e 17-AAG.....	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Carcinoma Epidermóide Bucal.....	16
2.2 PTEN	20
2.3 p53.....	27
2.4 Mdm2	34
2.5 Akt	40
2.6 Hsp90 e 17-AAG.....	44
3 PROPOSIÇÃO	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
5 RESULTADOS.....	59
6 DISCUSSÃO.....	71
7 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS	84
ANEXOS.....	101

1 INTRODUÇÃO

Entre as principais causas de morte no Brasil, em números absolutos, figuram as neoplasias malignas como terceira causa, representando 12,9% em 2006, precedidas por doenças do aparelho circulatório e causas externas. Entre os países com as maiores incidências de câncer destaca-se o Brasil, e, de acordo com registros do Instituto Nacional do Câncer (Brasil, 2006), as mais altas taxas encontram-se em Porto Alegre, Fortaleza e Belém.

Devido à função e à localização, a boca está continuamente em contato com diversos agentes químicos, físicos e biológicos, os quais, atuando isolada ou conjuntamente, aumentam o risco de câncer. A incidência do câncer de boca tem, em geral, acompanhado os padrões de consumo de tabaco e de álcool.

Conforme dados do INCa o câncer de boca figura como a sétima forma de neoplasia mais freqüente no Brasil, sendo os carcinomas epidermóides as neoplasias bucais mais comuns, seguidos por outros carcinomas, sarcomas e pelo raro melanoma.

As neoplasias malignas são produto de distúrbios genéticos. Mutações nos genes que regulam os processos de replicação celular, apoptose e reparo de DNA estão diretamente envolvidos na aquisição do fenótipo maligno.

Uma das principais vias de sinalização intracelular, responsáveis por promover a sobrevivência celular e proliferação, é iniciada pela enzima PI3K, que é ativada por receptores tirosina-quinases ou por receptores acoplados à proteína G. PI3K fosforila o fosfolipídeo de membrana PIP2 para formar PIP3, que ativa a proteína Akt. A via PI3K – Akt promove a sobrevivência e a proliferação celular, atuando em cascata, por meio de fosforilação de várias proteínas alvo.

A proteína codificada pelo gene supressor de tumor PTEN é um exemplo interessante de antagonismo entre produtos de oncogene e de gene supressor de tumor. A proteína PTEN é uma lipídeo fosfatase que desfosforila a posição 3 de fosfatidilinosítídeos, tais como PIP3. Por meio da desfosforilação de PIP3, PTEN antagoniza as atividades de PI3K e Akt.

Recentes pesquisas publicadas na literatura indicam a presença de importante ligação entre as proteínas PTEN, Akt, Mdm2 e p53 em neoplasias malignas (GITALI; BOHDAN, 2003; KOHN; POMMIER, 2005). Em muitos cânceres, PTEN parece ser responsável pela inibição de Akt, desestabilização de Mdm2 e aumento dos níveis e função de p53.

As supracitadas afirmações nos impulsionaram a investigar a relação da proteína Akt com as proteínas PTEN, Mdm2 e p53 em uma linhagem de queratinócito imortalizado e em quatro linhagens de células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, tendo o fator de crescimento epidermal (EGF) como indutor de proliferação e 17-AAG como inibidor de proliferação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma Epidermóide Bucal

Câncer de boca é a sexta mais comum neoplasia maligna no mundo. O mais comum tipo de neoplasia maligna bucal é o carcinoma epidermóide, o qual é responsável por nove em dez lesões malignas diagnosticadas (LIM et al., 2005). Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (Brasil, 2006) para 2006, serão diagnosticados mais de 11 mil novos casos no Brasil de carcinomas epidermóides bucais.

O tabaco possui um papel bem estabelecido na etiologia do carcinoma epidermóide bucal, sendo responsável tanto pelo processo de iniciação como de promoção (KARI et al., 1997). O tabaco chega a aumentar em cinco vezes o risco de desenvolvimento de carcinoma epidermóide e quando o álcool está associado ao tabaco o risco de desenvolver a malignidade pode chegar a 15 vezes (VARGAS et al., 2000). Jaber et al. (1999) afirmou que o risco de desenvolvimento de displasia epitelial bucal diminui consideravelmente em pacientes que param de fumar por um período maior de 10 anos. Adicionalmente, o hábito de mascar betel é considerado como um dos maiores fatores de risco para o carcinoma de epidermóide bucal em alguns países asiáticos como Índia, Paquistão e Sri-Lanka (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASSURIYA, 2004).

A nicotina é o maior constituinte do tabaco, sendo responsável por causar sua dependência. As nitroaminas derivadas da nicotina, especialmente a nitrosamina N-

nitrosonornicotina (NNN) e a 4- (metilnitrosamina -1-(3-piridil) -1- butanona (NNK), são sugeridas como participantes da carcinogênese do tabaco. A nicotina atua inibindo a apoptose, ao controlar a ação de enzimas proteína kinase C e a proteína nitrogênica ativadora de kinase. Ao lado desses efeitos, a nicotina modula os fatores de crescimento TNF- α (fator de necrose tumoral α), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF- β (fator de crescimento transformante β) que em conjunto estimulam a proliferação celular (PRADO; TAVEIRA, 2003).

Ao consumo de álcool é atribuído um papel de promotor nos carcinomas epidermóides bucais promovendo um efeito sinérgico com o tabagismo. O exato mecanismo como o consumo de álcool resulta na elevação do risco de desenvolvimento de carcinoma bucal permanece obscuro, pois os consumos de fumo e álcool em geral coexistem nos indivíduos (WEE; AGUDA, 2006). Alguns mecanismos têm sido propostos: o álcool pode atuar como solvente, facilitando a passagem dos carcinógenos através da membrana celular; o etanol pode alterar enzimas microssomais envolvidas no metabolismo dos carcinógenos no fígado, podem ativar substâncias carcinógenas; ou ainda ocasionam uma alteração do metabolismo intracelular das células epiteliais, que pode ser agravado por deficiências nutricionais. Entretanto, o etanol puro, por si só, não foi provado ser carcinogênico para a mucosa de boca (WILLIANS, 2000).

A neoplasia acomete, geralmente, pacientes a partir da sexta década de vida, sendo que pacientes com menos de 45 anos considerados jovens (LAM; LOGAN; LUKE, 2006). Os homens são mais acometidos que as mulheres em uma proporção de 3 a 2:1, proporção esta que vem diminuindo com o passar dos anos, em função do aumento, entre as mulheres, do consumo de tabaco e álcool (CANTO; DEVESSA,

2002; CHEN; LIN; LIN, 1998; DURAZZO et al., 2005; HUSSEINNY et al., 2000; KANDIL; HAY, 2000; VORA et al., 2003).

A língua, seguida do assoalho bucal, é o sítio mais comum de origem do carcinoma epidermóide bucal, com valores em torno de 50% das amostras em vários estudos, sendo o principal local, também, nos pacientes que não apresentam o hábito de fumar e naqueles pacientes considerados jovens (ANTUNES et al., 2001; CANTO; DEVESA, 2002; HUSSEINY et al., 2000; LAM; LOGAN; LUKE, 2006; VORA et al., 2003).

Em relação aos fatores prognósticos as margens cirúrgicas, localização e o hábito de fumar são indicadores prognósticos independentes (HUSSEINY et al., 2000). Segundo Lam, Logan e Luke (2006) e West, Castillo e Dennis (2002) a localização anatômica da lesão deve ser considerada como uma indicadora de prognóstico, já que os tumores apresentam comportamentos diferentes dependendo da localização anatômica. Para os primeiros autores, a língua e assoalho bucal conduzem a um pior prognóstico, em função da maioria dos casos que acomete tais localizações se apresentarem com grandes dimensões.

A quantidade de carcinógenos na saliva, em certas regiões da boca, tem sido proposta como uma das explicações para a gravidade e para a maior freqüência da localização do carcinoma epidermóide ao longo da superfície lateral e ventral da língua (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000). Essas localizações podem ser consideradas de risco porque recebem a maior concentração dos agentes carcinógenos do fumo, além disso, a ausência de queratina nessas regiões pode contribuir para a vulnerabilidade dos tecidos aos carcinógenos. Em contraste, a presença de queratina tem sido sugerida como protetor da gengiva para os efeitos carcinógenos do fumo de tabaco (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000).

Dieta que inclua peixe fresco e vegetais ricos em betacarotenos, vitamina C e vitamina E tem sido associada com redução do risco de desenvolvimento de carcinoma epidermóide de boca (CANTO; DEVESA, 2002).

Para Lam, Logan e Luke (2006) o estadiamento clínico TNM (tumor/nodal/metástase) é um sistema internacional importante para o registro de câncer, avaliação prognóstica, formulação do plano de tratamento e comparação dos resultados do tratamento, sendo considerado como um dos melhores indicadores de prognóstico do carcinoma epidermóide bucal. Entretanto, para Haddadin et al. (2000) a classificação clínica TNM define o tumor primário em apenas duas dimensões, sendo sugerido que uma terceira dimensão, espessura tumoral ou a profundidade de invasão sejam consideradas como fatores de risco para metástases cervicais.

A escolha do tratamento depende da localização e do tamanho do tumor primário, da idade e saúde geral do paciente, da morbidade associada ao tratamento, da experiência e habilidade do cirurgião e do radiologista oncológico, além dos anseios do paciente (HUSSEINY et al., 2000). Bova, Cheung e Coman (2004) mostraram um aumento nos resultados funcionais e boa qualidade de vida em pacientes com carcinomas localizados na base da língua tratados com radioterapia quando comparados àqueles tratados com cirurgia. Convém ressaltar que a radioterapia é a terapia de eleição para os casos avançados, independente do sítio bucal de acometimento, complementada, quando possível com a cirurgia ou mesmo associada à quimioterapia (HADDADIN et al., 2000).

Para Shingaki et al. (2003) a utilização da quimioterapia antes da cirurgia aumenta os índices de sobrevida e diminui consideravelmente a taxa de metástases a distância quando comparado com seu uso após a cirurgia, tendo como principal

vantagem, a possibilidade de controle subclínico das metástases à distância. Os autores afirmam, ainda, que o uso da quimioterapia sistêmica adjuvante deve ser amplamente considerado em pacientes com envolvimento dos linfonodos.

2.2 PTEN

O gen PTEN (do inglês *encoding phosphate and tensin homologue*) está localizado no cromossomo 10q23.3. A proteína PTEN é constituída por 403 aminoácidos e faz parte da grande família de proteínas tirosina-fosfatase (PTP). Esta proteína é formada por dois principais domínios estruturais: domínio C2 e domínio fosfatase (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006; OKI et al., 2005).

O domínio C2 é uma região de afinidade lipídica responsável pela união de PTEN à membrana plasmática através de mecanismo cálcio-independente. O domínio fosfatase apresenta a região N-terminal que se liga ao fosfatidilinositol e a região C-terminal que se liga a PDZ (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006).

A maioria das fosforilações de PTEN ocorre nos resíduos serina, menos de 1% ocorre na fração fosfotreonina e nos resíduos fosfotirosina (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006). Os mais freqüentes sítios de fosforilação são serina 370 e serina 385, contudo a fosforilação de outros sítios (fosfotirosina 240, fosfotirosina 315, fosfotreonina 319, fosfotreonina 321, serina 362, fosfotreonina 366, serina 380, fosfotreonina 382, fosfotreonina 383 e fosfotreonina 401) tem sido demonstrada

(ADEY, 2000; GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006; MILLER et al., 2002; RAFTOPOULOI et al., 2004).

Embora serina 370 e serina 385 sejam os principais sítios de fosforilação de PTEN a mutação destes sítios repercute em pequenas conseqüências funcionais nesta proteína. Em contrapartida os sítios serina 380, fosfotreonina 382 e fosfotreonina 383, aparentemente de menor importância, quando apresentam mutações em seus resíduos ocasionam a perda da estabilidade estrutural de PTEN o que dificulta a adesão desta proteína à membrana plasmática (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006).

Sumitomo et al. (2004) identificaram interação entre o domínio intracelular da membrana plasmática, denominado domínio NEP (*neutral endopeptidase*), e o domínio C-terminal de PTEN. A interação entre PTEN e NEP não requer fosforilação dos sítios e torna possível o recrutamento da fosfatase para a membrana citoplasmática. Deste modo, NEP pode regular Akt através de mecanismo independente da atividade proteolítica.

CK2 (*Casein kinase*) é uma serina-treonina quinase, que regula a morfologia celular do citoesqueleto, apontada como a principal proteína responsável pela fosforilação de PTEN. Estudos *in vitro* mostram que CK2 fosforila PTEN na serina 370 e serina 385, reduzindo a atividade fosfatase de PTEN em cerca de 30%. PTEN fosforilado por CK2 é ainda menos susceptível à proteólise por caspase-3 (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006).

Outras proteínas-quinase como, por exemplo, Rock (*RhoA-associated Kinase*) e MAT205 (*microtubule-associated kinase*) através de seus domínios PDZ fosforilam PTEN em sua região N-terminal (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006).

Recentemente, Al-Khouri e colaboradores relataram que GSK 3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*) fosforila PTEN na serina 362 e fosfotreonina 366, indicando que esta interação pode fazer parte de um *feedback* negativo da via PI3K (*fosfatidilinositide 3 kinase*) (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006).

PTEN é classificada como enzima de interface do tipo *hopping enzyme* por promover seu rápido desprendimento da membrana e por sua capacidade de trafegar no interior de vesículas (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006).

Evidências sugerem que o controle de PTEN na via Akt desempenha um importante papel na modulação da degradação de p53 dependente de Mdm2 (FREEMAN et al., 2003; KOHN; POMMIER, 2005; STAMBOLIC et al., 2001).

A proteína PTEN atua como supressor tumoral ao desfosforilar a posição 3 de fosfatidilinosítídeos, tal como ocorre com PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), onde a desfosforilação ocorre na posição 3 de inositol, produzindo PIP2 (fosfatidilinositol 3,4,5-bifosfato) (OKI et al., 2005). PIP2 e PIP3 foram detectados tanto na membrana plasmática quanto em endomembranas celulares. A presença de proteínas PIP (fosfatidilinositol-fosfato) no núcleo foi confirmada através da extração de lisados nucleares (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006). PIP3, localizado na membrana nuclear, promove a sobrevivência celular por inibir a fosfoproteína nucleolar B23, o que sugere que PTEN, tanto no núcleo como no citoplasma, pode atuar como um regulador chave para a sobrevivência celular (JI-HYUN; CHARIS, 2005).

Leslie e Dones (2004) demonstraram que a quantidade de PTEN é regulada através de efeitos na estabilidade da proteína e observaram que a fosforilação de PTEN apresenta estabilidade relativa. A desfosforilação do resíduo C-terminal de

PTEN resulta em ativação funcional de PTEN e em sua dramática desestabilização. Pouco é conhecido acerca da regulação precisa ou mecanismo para a proteólise de PTEN, porém vários estudos têm apontado para uma degradação proteossomal, uma vez que a estabilidade de PTEN parece aumentar quando a ação dos proteossomos é inibida, mesmo porque formas ubiquitinizadas de PTEN já foram detectadas (LESLIE; DONES, 2004).

PTEN também é capaz de desfosforilar a si própria, assim como é capaz de remover fósforo da proteína quinase de adesão focal e dos receptores de fator de crescimento derivado de plaqueta (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006).

Por meio da desfosforilação de PIP3, PTEN antagoniza as atividades de PI3K e Akt, que podem atuar como oncogenes por promoverem a sobrevivência celular. (KOHN; POMMIER, 2005; PANIGRAHI et al., 2004; SIMPSON; PARSONS, 2001; STAMBOLIC et al., 2001). Ao evitar a fosforilação de Akt, PTEN parece não somente controlar a fosforilação de Mdm2 patrocinada por Akt, como também é capaz de regular negativamente a transcrição de Mdm2 (BETTENDORF; PIFFKO; BÄNKFALVI, 2004).

Alguns estudos sinalizam que PTEN pode controlar a atividade promotora de Mdm2 por dois mecanismos distintos. O primeiro é através da interferência direta na região promotora P2 de Mdm2-p90 (sítio este responsável pela união de p53 à Mdm2). A segunda forma pela qual PTEN regula negativamente a transcrição de Mdm2 é por modulação da região promotora P1. Neste segundo caso, PTEN regula a transcrição de Mdm2-p76 de forma indireta através da modulação da atividade de fatores de transcrição, ainda desconhecidos. Pesquisas indicam que PTEN

apresenta um papel supressor das duas isoformas de Mdm2 independentemente da atividade de p53 (CHANG; FREEMAN; WU, 2004; OKI et al., 2005).

PTEN e p53 são importantes proteínas supressoras tumorais e estão funcionalmente relacionadas (KOHN; POMMIER, 2005). Recentes estudos têm demonstrado que PTEN está relacionado diretamente ao controle de estabilidade da proteína p53, tanto no mecanismo fosfatase-dependente ao antagonizar a via Akt-Mdm2, quanto no mecanismo fosfatase-independente através da interação direta p53-PTEN (FREEMAN et al., 2003; LI et al., 2006; MAYO; DONNER, 2001). A ativação de p53 através de sua acetilação mediada por p300/CBP resulta em alteração conformacional de p53 que se transforma em um tetramero, o que viabiliza a interação entre p53 e PTEN. A importância da tetramerização do domínio de p53 é enfatizada em mutações do domínio de p53 encontradas na Síndrome de Li-Fraumeni e cânceres humanos (HAINAUT; HOLLSTEIN, 2000; VARLEY et al., 1996).

A proteína PTEN se liga estruturalmente a p53 no núcleo através de p300/CBP formando um complexo PTEN-p300-p53. A formação deste complexo resulta em aumento da atividade transcricional de p53. É importante ressaltar que ambas as associações PTEN-p300 e PTEN-p53 estão significativamente aumentadas após o tratamento com radiação ionizante e ultravioleta, indicando que estas interações desempenham papel na manutenção da forma p53-acetilada em resposta ao dano em DNA (LI et al., 2006).

O complexo p53-PTEN acentua a atividade transcricional de p53 junto ao DNA e induz a transcrição do gene PTEN, elevando os níveis celulares desta proteína. Em razão disso é de fundamental importância a função de PTEN no controle da atividade de p53, uma vez que a ausência de PTEN funcional resulta na perda da atividade de p53 e na inabilidade das células neoplásicas em responder a

danos em seu DNA através da indução de reparo ou apoptose (FREEMAN et al., 2003; OKI, et al., 2005; STAMBOLIC et al., 2001).

Em síntese PTEN inibe Akt, desestabiliza Mdm2 e ainda é capaz de aumentar os níveis e a função de p53 (KOHN; POMMIER, 2005; TROTMAN; PANDOLFI, 2003).

Por muito tempo PTEN foi considerada uma proteína exclusivamente citoplasmática. Recentes relatos sinalizaram que PTEN se localiza em ambas regiões celulares, núcleo e citoplasma, com principal localização nuclear em células normais diferenciadas ou na fase G0 (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006; LI et al., 2006).

O mecanismo pelo qual PTEN é transportado para o núcleo ainda não foi bem elucidado. Existem duas principais teorias: a primeira teoria indica a associação de PTEN com *vault protein*, as partículas *vault* se localizam no citoplasma e executam o transporte de PTEN para o núcleo; a segunda teoria especula que PTEN entra no núcleo por difusão passiva (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006).

PTEN, quando se localiza no núcleo, apresenta também importante papel no controle e parada do ciclo celular na fase G1 através da inibição da ciclina D1 e aumento dos níveis de p27. PTEN nuclear promove ainda a diminuição da fosforilação de MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006; JI-HYUN; CHARIS, 2005;). Deste modo a presença nuclear de PTEN em células normais está inversamente relacionada à proliferação celular e diretamente correlacionada à diferenciação celular (LIAN; JI-HYUN; CHARIS, 2005).

Convém mencionar que alguns estudos demonstraram que PTEN possui principal localização no citosol, sendo uma pequena fração associada à membrana plasmática responsável pela ação funcional de PTEN. Outros trabalhos, entretanto,

apontaram significativa marcação nuclear em certos tipos celulares (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006; LI et al., 2006). A localização nuclear de PTEN é raramente vista em cultura de células, com exceção das células PC12 e células de músculo liso (LESLIE; DOWNES, 2004).

Em cultura de células normais, estudos utilizando imunofluorescência identificaram forte localização de PTEN na membrana plasmática e localização difusa no citosol (LESLIE; DOWNES, 2004).

Recentes pesquisas em linhagens celulares de câncer de ovário têm demonstrado que PTEN pode influenciar na função celular independentemente da via PI3K/Akt (YAN et al., 2006). Os autores demonstraram que a expressão de PTEN resulta em *up-regulation* de p53 e ativação da caspase-3 sem que haja interação com a via Akt.

Além das relações bem estabelecidas de PTEN com as proteínas Mdm2, p53 e Akt, PTEN é capaz de induzir a apoptose e suprimir o crescimento celular através da supressão de NFκB (*nuclear factor κB*) (YAN et al., 2006).

Estudos em adenocarcinomas gástricos revelam que 10 a 50% destas neoplasias apresentam perda no cromossomo 10q ou 17q, nos quais PTEN e p53 estão respectivamente localizados (OKI et al., 2005). PTEN e p53 estão frequentemente mutados em neoplasias humanas, porém a mutação simultânea de ambos não é comum (FREEMAN et al., 2003; KOHN; POMMIER, 2005; STAMBOLIC et al., 2001).

PTEN foi originalmente identificado como um gene mutado em diversos tipos de cânceres esporádicos e em pacientes com síndromes que predisõem ao câncer como é o caso da Doença de Cowden (CULLY et al., 2006).

Recentes estudos demonstraram que a expressão isolada do domínio C2 de PTEN, na ausência do domínio fosfatase, tem a capacidade de suprimir a motilidade celular, desse modo PTEN desempenha importante papel na supressão de metástases (PANIGRAHI et al., 2004).

PTEN está mutado em 40-50% dos gliomas de alto grau e em neoplasias de próstata (100%), endométrio, mama (6-10%), tireóide e pulmões (FREEMAN et al., 2003; KOHNO et al., 1998; MAYO; DONNER, 2001; MCMENAMIN et al., 1999; PANIGRAHI et al., 2004; SIMPSON; PARSONS, 2001).

Em glioblastoma, melanoma e câncer de próstata mutações e deleções alélicas de PTEN são observadas em estádios mais avançados da doença (OKI et al., 2005).

Mutações em PTEN também foram detectadas em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço (SINGH et al., 2002), nas quais os efeitos da mutação em p53 e Akt apresentaram-se independentes de PTEN. A expressão de PTEN encontrava-se ausente ou insignificante nestas linhagens celulares (SINGH et al., 2002).

2.3 p53

p53 é uma fosfoproteína nuclear de 53 KDa, formada por 393 aminoácidos. A proteína p53 é uma supressora tumoral de vida curta (em torno de 20 min.) e por isso, difícil de ser detectada em células normais (FENG et al., 2004).

A função principal de p53 é evitar danos ao DNA funcionando como um fator promotor de transcrição de genes específicos (BETTENDORF; PIFFKO, BÀNKFALVI, 2004; OKI et al., 2005; STAMBOLIC et al., 2001).

As células são extremamente sensíveis aos níveis de p53 em razão de sua ativação transcricional. Na ausência de estresse, em células normais, são mantidos baixos níveis de p53, em geral isso ocorre através da constante degradação proteossomo-dependente, mediada pela proteína Mdm2 (*murine double minute*) que atua como uma p53 ubiquitina-ligase (MA et al., 2006; TROTMAN; PANDOLFI, 2003).

O gene P53 é ativado por uma variedade de estímulos que incluem dano ao DNA, hipóxia, inflamação, produção de óxido nítrico e ativação de oncogenes (MA et al., 2006).

Em resposta ao estresse celular p53 é estabilizada e se acumula no núcleo formando tetrâmeros capazes de se ligar ao DNA. Quando ativada p53 promove a expressão de genes que promoverão a parada do ciclo celular (p21; 14-3-3 ϕ ; PTGF- β), como também de genes que são capazes de induzir a senescência e a apoptose (BAX, NOXA, PUMA, p53AIP1, PIGs, APAF-1, PERP) (BROOKS; GU, 2006; STOMMEL; WAHL, 2004). Pesquisas recentes apontam que a senescência, induzida pela ativação de *ras* ou p53, pode prevenir a progressão neoplásica (CHEN et al., 2005; DAI et al., 2006; MICHALOGLOU et al., 2005; STOMMEL; WAHL, 2004).

p53 especificamente se liga a uma reconhecida sequência de DNA constituída por 10 pb (5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3'), localizados na região promotora ou em introns de genes alvo (SODERLUND; PÉREZ-TENÓRIO; STÄL, 2005).

Citocinas e fatores de crescimento podem modificar a resposta de p53 através da fosforilação de diferentes sítios desta proteína. Quando ocorre situação de estresse celular há fosforilação de p53, no sítio serina 46, que resulta em indução de p53 e apoptose. A fosforilação de p53 no sítio serina 15, quando relacionada com a ativação do oncogene *ras* e sinalização de MAPK, promove indução da senescência. A fosforilação da serina 15 aumenta a habilidade de p53 em interagir com p300/CBP durante a indução da senescência celular (FERBEYRE et al., 2002). Porém, quando a célula apresenta ação dominante da oncoproteína E1A, a proteína *ras* não é capaz de induzir a fosforilação da serina 15 e a célula não entra em senescência, mas sim em apoptose (WANG et al., 2005).

Sinais induzidos por *ras* podem diretamente modular a atividade de p53 por promover diferentes mudanças conformacionais nesta proteína. Para promover a expressão dos genes alvos, a proteína p53 precisa se ligar a vários co-ativadores (FERBEYRE et al., 2002). Embora os mecanismos precisos para ativação de p53 não estejam completamente elucidados, eles geralmente envolvem modificações pós-transcricionais, incluindo ubiquitinização, acetilação, fosforilação, metilação e glicosilação do polipeptídeo p53 (BROOKS; GU, 2006). Um mecanismo bem descrito, que ocorre durante o estresse celular, é a competição direta entre acetilação e ubiquitinização dos resíduos de lisina na região C-terminal de p53 (BROOKS; GU, 2006).

Existem vários mecanismos responsáveis por controlar a via p53-Mdm2 durante o período de estresse celular. Dentre estes mecanismos é possível destacar modificações pós-transcricionais de p53 e Mdm2 e interação com outras

proteínas celulares, como ocorre com p14 (ARF – fator de ribosilação do ADP) (BROOKS; GU, 2006).

A ubiquitinização regula diversas ações da maquinaria celular através da promoção de sinais específicos para degradação de proteínas intracelulares e interferência indireta em funções celulares independentes de ubiquitinização (BROOKS; GU, 2006). A literatura confirma que a ubiquitinização proteossomo-dependente é a principal via de regulação de p53. Os principais sítios para ubiquitinização de p53 estão localizados na região C-terminal, e a acetilação destes sítios bloqueia a degradação de p53 resultando em sua estabilização (BROOKS; GU, 2006).

Os níveis e a atividade de p53 são amplamente controlados por Mdm2, uma vez que Mdm2 se liga diretamente a p53 promovendo sua ubiquitinização e posterior degradação pelo proteossomo (DAI et al., 2006; TROTMAN; PANDOLFI, 2003; ZHOU et al., 2001). A proteína p53 é responsável pela ativação de Mdm2, porém em alguns casos pode ocorrer a auto-acetilação de Mdm2. Por outro lado, a acetilação do domínio RING de Mdm2 inativa esta proteína e causa aumento na atividade transcricional de p53 (BROOKS; GU, 2006).

Pesquisas recentes sinalizam que Mdm2 pode catalisar p53 de duas formas dose-dependentes: mono-ubiquitinização e poli-ubiquitinização. Baixos níveis de atividade de Mdm2 induzem a mono-ubiquitinização e exportação nuclear de p53, altos níveis de Mdm2 promovem a rápida poli-ubiquitinização de p53 e degradação desta proteína por proteossomos nucleares. A poli-ubiquitinização Mdm2-mediada e nuclear degradação de p53 pode desempenhar um papel crítico na supressão de p53 durante os estágios mais tardios da

resposta ao dano em DNA ou quando ocorre a superexpressão de Mdm2 (BROOKS; GU, 2004; BROOKS; GU, 2006).

Stommel e Wahl (2004) também demonstraram que Mdm2 pode ser degradada juntamente com p53 no núcleo.

A proteína p53 no citoplasma apresenta importante papel na apoptose através de interações com mitocôndrias. No citoplasma p53 pode ativar a proteína pro-apoptótica Bax, bloquear o complexo anti-apoptótico Bak-Mcl1 e interagir com citocromo c, desempenhando, dessa forma, funções pró-apoptóticas (BROOKS; GU, 2004).

A proteína p14, originalmente identificada como um fator de transcrição alternativo para induzir o aumento dos níveis do supressor tumoral INK4 (supressor da CDK4/6), também pode controlar os níveis de p53, uma vez que p14 se liga a Mdm2 inibindo a degradação de p53 via Mdm2 (BROOKS; GU, 2006). A ativação da via p14/p53 resulta em apoptose ou senescência, dependendo do tipo de dano celular (FERBEYRE et al., 2002).

Outro importante modulador da interação entre p53 e Mdm2 é a pequena molécula Nutlin. Nutlin tem se mostrado um inibidor específico da formação do complexo p53-Mdm2, ativando p53 e inibindo o crescimento tumoral *in vivo* (BROOKS; GU, 2006).

Lindsey e Donner (2002) descobriram uma nova família de bloqueadores de Mdm2, trata-se de HLI98. HLI98 especificamente bloqueia a atividade E3 ubiquitina-ligase de Mdm2.

Existe ainda a ubiquitinização de p53 independente de Mdm2. Tratam-se de outras proteínas E3 ligase. O primeiro exemplo é a proteína Pirh2. Essa

proteína é uma E3 ligase com um domínio RING-H2 que interage com p53 promovendo sua ubiquitinação e degradação via proteossomo. Similar a Mdm2, Pirh2 é um gene relacionado à p53 e também apresenta *feedback* auto-regulatório. Outro exemplo é a proteína COP1, descrita recentemente como uma ubiquitina ligase de p53. COP1 é um gene com transcrição induzida por p53. A proteína COP1 é capaz de ubiquitinar e degradar p53. E, finalmente, merece destaque, a proteína ARF-BP1 (ARF binding partner), recentemente identificada como uma E3 ligase com um domínio HECT. ARF-BP1 também é capaz de ubiquitinar e degradar p53 (BROOKS; GU, 2006).

Mdm2, COP1, Pirh2 e ARF-BP1 representam um conjunto de proteínas E3 ligases capazes de regular e manter os níveis de p53. É lícito afirmar, então, que os mecanismos Mdm2-dependente, como Mdm2-independente usados em parceria pela maquinaria celular são responsáveis por controlar os níveis de p53 (BROOKS; GU, 2006).

Por outro lado, várias proteínas ribossomais incluindo L5, L11 e L23 que estão usualmente reunidas no interior do complexo translacional 80S também foram recentemente identificadas como bloqueadores do *feedback* Mdm2-p53. Estas proteínas ribossomais são ativadas em resposta ao estresse ribossomal e ainda parecem atuar como “sensores” para detectar o estresse do nucléolo (BROOKS; GU, 2006).

Recentes pesquisas relatam que a superexpressão de L5, L11 e L23 inibe a ubiquitinação de p53 mediada por Mdm2. Dai et al. (2006) demonstraram que L5 e L23 inibem a auto-ubiquitinação de Mdm2 através do recrutamento de certas ubiquitinas hidrolases como é o exemplo de HAUSP (*herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*), resultando em desubiquitinação de

Mdm2 e p53. Os autores ainda concluíram que L11 bloqueia *in vitro* a degradação de Mdm2 via proteossomo 26S através de um processo pós-ubiquitinização, o que ocasiona um aumento das formas ubiquitinizadas de p53 e Mdm2 (COPELAND; LAI, 2006). O dano em DNA também pode estimular a ligação da proteína ribossomal L26 na região 5' do mRNA de p53 ocasionando aumento da transcrição da proteína p53 (BROOKS; GU, 2006).

A ubiquitinização reversível de p53 está fortemente relacionada à proteína desubiquitinase HAUSP. HAUSP pode se ligar a p53 desubiquitinizando-a e se ligar a Mdm2 resultando também em sua desubiquitinização. A desubiquitinização de p53 é uma forma rápida e eficiente de estabilizar esta proteína em resposta ao estresse celular. Na presença de HAUSP os níveis de p53 são estabilizados e induzem a parada do ciclo celular e apoptose (BROOKS; GU, 2006).

O supressor tumoral p53 ativa a transcrição de PTEN e deste modo funciona como um regulador negativo da via de sinalização PI3K (STAMBOLIC et al., 2001).

Diante das citadas funções de p53 não é surpreendente que esta proteína seja frequentemente inativada durante o processo de carcinogênese. O mecanismo mais comum de inativação de p53 é a mutação do gene p53 que ocorre em mais de 50% de todas as neoplasias malignas em humanos (VARA et al., 2004), sendo o gene supressor tumoral mais comumente mutado em cânceres humanos, incluindo carcinomas localizados em cabeça e pescoço (OKI et al., 2005; SINGH et al., 2002; ZHOU et al., 2001). Em algumas neoplasias o gene p53 em sua forma selvagem está presente, mas não há proteína p53 funcionalmente ativa, sugerindo que alguns sinais oncogênicos sejam capazes de suprimir a função de p53 (SINGH et al., 2002).

Vara et al. (2004), através de pesquisa realizada em cultura de células originadas de câncer de bexiga, observaram que a forma selvagem de p53 estava presente, porém não-funcional. Os autores verificaram que a supressão funcional de p53 estava relacionada a superexpressão de Mdm2.

Em linhagens celulares de câncer de cólon o aumento de p53 foi correlacionado ao aumento de PTEN e diminuição dos níveis de pAkt e PI3K, estes resultados indicam uma regulação negativa da via PI3K/Akt dependente de PTEN nestas células (SINGH et al., 2002).

Em carcinoma epidermóide do trato aerodigestivo superior mutações em p53 foram encontradas em 47% dos casos (SINGH et al., 2002).

Mutações no gene p53 estão localizadas no cromossomo 17p e são descritas em 15 a 19% das lesões bucais potencialmente malignas. Estes achados indicam que a mutação em p53 é um precoce evento na carcinogênese bucal (CRUZ et al., 1998).

O envolvimento de mutações de p53 na carcinogênese do trato aerodigestivo é bem documentado (BENNETT; HOLLSTEIN; METCALF, 1992; CHUNG; MUKHOPADHYAY; KIM, 1993; WARIDEL; ESTREICHER; BRON, 1997). Mais de 80% dos carcinomas epidermóides bucais apresentam mutações em p53, indicando que a mucosa bucal é um dos sítios que mais comumente sofrem mutações em p53, sendo esta mutação essencial para o desenvolvimento de carcinomas epidermóides em boca (CRUZ et al., 1998).

Finalmente, Yanamoto et al. (2002) mostraram a existência de mutação do gene p53 em carcinoma epidermóide de boca e em metástases de linfonodo.

2.4 Mdm2

O gene MDM2 (*murine double minute*) foi originalmente identificado como um dos três genes (MDM1, 2 e 3) que estavam sobre-expressados em células de camundongo BALBc transformadas espontaneamente (LIANG; LUNEC, 2005). Os genes MDM foram localizados nos corpos nucleares extra-cromossômicos, denominados *double minutes*. Camundongos com perda completa de MDM2 morrem precocemente, ainda como embriões, ratificando a importância de MDM2 como um regulador negativo necessário para reprimir a função de p53, durante a embriogênese dos vertebrados.

O gene MDM2 foi mapeado posteriormente em humanos e está presente no cromossomo 12q13-14, e sua principal função é regular os níveis e a atividade de p53 (KOHN; POMMIER, 2005; SIMPSON; PARSONS, 2001).

Mdm2 é uma proteína nuclear, com vida média de 5 a 30 minutos, constituída por 491 aminoácidos, porém somente 127 aminoácidos são necessários para interagir com p53. Mdm2 é uma fosfoproteína E3 ubiquitina-ligase membro da família *Ring finger* que apresenta quatro domínios funcionalmente independentes: (a) domínio N-terminal que reconhece o domínio N-terminal Box-I de p53; (b) domínio ácido central, que se liga a inúmeras proteínas, com destaque para pRb, p14, L5, L11, L23 e p300/CBP; (c) domínio *zinc finger*; (d) domínio *Ring finger* responsável pela atividade E3 ubiquitina-ligase (MA et al., 2006).

A interação de Mdm2 com p53 ocorre através de seu domínio NH2 terminal de Mdm2 com o domínio NH2 da proteína p53. Esta interação resulta no bloqueio da atividade de transcrição da proteína p53 (KOHN; POMMIER, 2005). Em recente

estudo Copeland e Lai (2006) demonstraram que p53 se liga a dois domínios de Mdm2, o domínio N-terminal e o domínio central.

Os resíduos de glicina 58, glutamina 68 e cisteína 77 de Mdm2 são imprescindíveis para a ligação à proteína p53, assim como o domínio *Ring finger* de Mdm2 é essencial para exportação de p53 para o citoplasma e posterior degradação de Mdm2. Os aminoácidos Phe-19, Trp-23 e Leu-26 são essenciais para que p53 possa se ligar à proteína Mdm2 (LIANG; LUNEC, 2005).

Mdm2 regula a atividade de p53 tanto no núcleo como no citoplasma. No núcleo a proteína Mdm2 se liga a p53 e inibe sua atividade transcricional, o complexo Mdm2-p53 pode migrar do núcleo para o citoplasma ou ser degradado no próprio núcleo celular. No citoplasma Mdm2 funciona como uma E3-ubiquitina-ligase e p53 se torna alvo da degradação pelo proteossomo. As proteínas p53 e Mdm2 possuem *feedback* auto-regulado, assim p53 regula positivamente Mdm2, estimulando a transcrição do gene Mdm2. A proteína Mdm2, por sua vez, regula negativamente p53 (KOHN; POMMIER, 2005; MA et al., 2006).

A mera ligação de p53 com Mdm2 é suficiente para bloquear a atividade transcricional de p53, mesmo quando não é seguida de subsequente degradação (SOLIT et al., 2003). A importação e exportação nuclear é um aspecto das proteínas p53 e Mdm2 com implicações em suas regulações funcionais (VESTHEY et al., 2005).

A interação entre Mdm2 e p53 tem seu início no núcleo. Neste local, Mdm2 liga-se a p53 inibindo sua atividade transcricional através da ligação de Mdm2 à acetilase p300/CBP (do inglês *CREB-binding protein*), um co-ativador transcricional com importante papel na degradação eficiente de p53. A consequência da interação Mdm2-p300/CBP é a formação de um complexo que estabiliza Mdm2, impedindo sua degradação. p300/CBP forma um complexo com Mdm2, *in vitro* e *in vivo*,

formando um braço que permitirá a degradação de p53 pelo proteossomo, por esta razão a maior parte de Mdm2 endógena encontra-se associada à p300/CBP.

p300/CBP possui também uma atividade transferase que se manifesta quando p300/CBP se liga unicamente à proteína p53, realizando a sua poliubiquitinização. A proteína p300/CBP, após se ligar à região N-terminal acetila e estabiliza p53 fosforilada, viabilizando sua atividade transcricional ao promover eliminação de ligações inespecíficas ao DNA, além de aceitar histonas (KOHN; POMMIER, 2005; ZHOU et al., 2001).

A disponibilidade da proteína Mdm2 define consequentemente a atividade da proteína p300/CBP. Na ausência de Mdm2 a proteína p300/CBP estimula a atividade transcricional de p53 e na presença de altos níveis de Mdm2, especialmente na atuação da forma fosforilada por Akt, há aumento da interação Mdm2 com p300/CBP e aumento da degradação de p53 (KOHN; POMMIER, 2005; ZHOU et al., 2001).

Mdm2 fosforilado por Akt, tem maior afinidade à proteína p300/CBP e praticamente não apresenta interação com p14. Em contrapartida, Mdm2 não fosforilado por Akt liga-se a p14, mas não à proteína p300/CBP. Paralelamente, p300/CBP, ao interagir com Mdm2, perde sua capacidade de acetilar p53 (ZHOU et al., 2001).

A maior parte do complexo de Mdm2-p53 é transportada para o citoplasma (KOHN; POMMIER, 2005). Uma vez no citoplasma ocorrerá ubiquitinização e degradação de p53 pelo proteossomo (GROSSMAN, 1997; LILL et al., 1997; MAYO; DONNER, 2001). Ubiquitinação é o processo através do qual proteínas chamadas de ubiquitinas se associam a outras proteínas conduzindo-as a degradação no proteossomo 26S, sendo este último um complexo protéico cilíndrico que reconhece

proteínas ubiquitinizadas (POMMIER; KOHN, 2005). A ubiquitinação ocorre tanto no núcleo como no citoplasma e envolve proteínas E1, E2 e E3. A proteína E1 é a primeira a se ligar e, desse modo, ativar a proteína ubiquitina. Em seguida a proteína ubiquitinizada é transferida para a enzima de conjugação E2 e posteriormente para a enzima E3. A enzima E3 é uma ligase que se une covalentemente a ubiquitina e a transfere para o substrato protéico a ser degradado no proteossoma (VESTHEY et al., 2005).

A proteína Mdm2 funciona como a ligase E3. Através de seu domínio RING, na porção C-terminal, Mdm2 não somente ubiquitina p53, como também ubiquitina a si mesma estimulando sua própria degradação efetuada também pelo proteossomo 26S (FENG et al., 2004; KOHN; POMMIER, 2005).

Mdm2 tem seu “feedback” regulado não somente por p53, mas também é regulado pela expressão da proteína ARF (p14 em humanos ou p19 em camundongos). A proteína p14 se liga diretamente ao domínio RING *finger* da proteína Mdm2 para bloquear a degradação de p53, interferindo na atividade E3 ubiquitina ligase de Mdm2. Através deste mecanismo p14 consegue manter Mdm2 no núcleo, inibindo sua própria degradação (ZHOU et al., 2001). Em resumo, a localização de Mdm2, no interior da célula, é controlada pelas proteínas p300/CBP, p14 e p53 (FENG et al., 2004; GROSSMAN, 1997; KOHN; POMMIER, 2005; LILL et al., 1997; MAYO; DONNER, 2001; ZHOU et al., 2001).

O gene MDM2 pode gerar duas proteínas diferentes funcionalmente e com controles regulatórios distintos. Deste modo, podemos encontrar duas isoformas de Mdm2, p76 e p90 (CHANG; FREEMAN; WU, 2004; FREEMAN; WU; LEVINE, 1999; KOHN; POMMIER, 2005).

Kohn e Pommier (2005) relataram que Mdm2 possui duas regiões promotoras: P1 e P2. A região promotora P1 presente na isoforma p76 de Mdm2 não possui domínio de ligação para p53, enquanto que a região promotora P2, presente na isoforma p90 de Mdm2 apresenta um domínio de ligação para p53. As regiões promotoras P3 e P2 são responsáveis pelo *feedback* auto-regulatório entre p53 e Mdm2. Lunec e Liang (2005) caracterizaram uma nova região promotora, localizada no intron 3 do gene MDM2 humano, chamada de P3.

A isoforma p76-Mdm2 por apresentar somente a região promotora P1 tem sua função independente da ação de p53. A isoforma p76-Mdm2 tem sua transcrição ativada por fatores de transcrição ainda desconhecidos, porém é certo que estes fatores de transcrição são inibidos por PTEN, independentemente da presença de p53 (KOHN; POMMIER, 2005).

A isoforma p90-Mdm2, que apresenta domínio P2, é ativada em resposta ao dano em DNA e é capaz de se ligar à proteína p53 inativando-a. (KOHN; POMMIER, 2005). A isoforma p76-Mdm2 pode antagonizar a isoforma p90-Mdm2 o que resulta em um aumento dos níveis de atividade de p53 (CHANG; FREEMAN; WU, 2004; KOHN; POMMIER, 2005).

Deleções em alguns exons do gene MDM2 podem gerar proteínas sem o domínio de ligação à proteína p53. Em humanos as duas proteínas que perdem exons são chamadas de mdm2-A (deleção dos exons 4 e 9) e mdm2-B (deleção dos exons 4 e 11). Estas duas proteínas não apresentam domínio de ligação à proteína p53. Por esta razão algumas neoplasias apresentam altos níveis de Mdm2 e p53 selvagem conjuntamente (CARDINALI et al., 1995).

Pommier e Kohn (2005), em seu trabalho de revisão, relataram que há dois promotores que patrocinam a transcrição de Mdm2, um promotor responsável pela

proteína curta (p76-Mdm2) que não apresenta o domínio de ligação à proteína p53, e outro promotor responsável pela transcrição integral da proteína (p90-Mdm2) que apresenta o domínio de ligação à proteína p53.

Embora Mdm2 tenha sido extensivamente caracterizada como um regulador de p53 existem consideráveis evidências de que Mdm2 apresenta funções p53-independentes (GITALI; BOHDAN, 2003). A expressão de Mdm2 durante o desenvolvimento é tecido-específica e independe de p53 nos diferentes órgãos. Altos níveis de expressão de Mdm2 são observados em linhagens celulares de neoplasias humanas que apresentam p53 subexpresso ou não funcional. O aumento dos níveis de Mdm2 tem sido também associado a via ras/MAP kinase. A ativação de ras pela via clássica ou através de mutações em células neoplásicas está associada ao aumento das funções de Mdm2. A regulação de Mdm2 em linhagens celulares de câncer de mama tem se mostrado independente de p53 e de Ras/MAP quinase, mas dependente de AP1-ETS (STOMMEL; WAHL, 2004).

Neoplasias malignas em humanos apresentando mutações simultâneas em p53 e MDM2 são raras, porém ambas mutações podem ocorrer dentro do mesmo tumor e resultar em um pior prognóstico. Cerca 12% dos pacientes com câncer de bexiga que exibem altos níveis de p53 e Mdm2 mutados apresentam pior prognóstico quando comparados aos pacientes que apresentam mutações em apenas um dos genes (GITALI; BOHDAN, 2003).

A superexpressão de Mdm2 é observada em muitos cancres humanos, e está relacionada a neoplasias agressivas, metastáticas e refratárias à quimioterapia (BETTENDORF; PIFFKO; BÀNKFALVI, 2004; YANAMOTO et al., 2002).

Aumentados níveis de transcrição de Mdm2 são observados em neoplasias malignas hematopoiéticas (BROOKS; GU, 2006).

Em carcinoma epidermóide bucal a expressão aumentada de Mdm2 pode estar relacionada com aumento de atividade proliferativa da lesão (YANAMOTO, et al., 2002).

2.5 Akt

Akt faz parte de uma grande família de proteínas quinases B (PKB). Em humanos existem três formas de Akt: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) e Akt3 (PKB γ), localizadas nos cromossomos 14q32, 19q13 e 1q44, respectivamente (TESTA; BELLACOSA, 2001).

Cada membro da família Akt contém um domínio amino-terminal homólogo à plectrina (domínio PH), um domínio curto ligante α -hélice e um domínio carboxi-terminal ligase. O domínio PH existe em diversas moléculas de sinalização e permite a ancoragem de proteínas na membrana celular via interações fosfolipídicas (TESTA; BELLACOSA, 1997).

A ativação de Akt é um processo de múltiplos passos que envolve seu deslocamento para membrana e subsequente fosforilação. A família de Akt quinases é o principal alvo *downstream* de receptores de fator de crescimento tirosina-quinase que utilizam a via de sinalização phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (DUBSKA; ANDERA; SHEARD, 2005; TESTA; BELLACOSA, 1997).

Em sua forma ativa PI3K apresenta uma subunidade regulatória chamada p85 e uma subunidade catalítica chamada p110. A ativação de PI3K resulta na formação de PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate) e recrutamento de Akt para a

membrana onde ocorre a fosforilação de Akt em seus sítios fosfotreonina 308/309 e serina 473/474 na região carboxi-terminal (DUBSKA; ANDERA; SHEARD, 2005).

A fosforilação do sítio fosfotreonina 308/309 é necessária para ativação de Akt e a fosforilação de serina 473/474 resulta em atividade máxima de Akt (TESTA; BELLACOSA, 2001).

Uma vez ativado, Akt fosforila diversas proteínas-alvo, incluindo proteínas reguladoras da sobrevivência celular, fatores de transcrição e outras proteínas quinase que regulam o metabolismo celular e a síntese protéica (DUBSKA; ANDERA; SHEARD, 2005).

Mayo e Donner (2001) demonstraram que a fosforilação de Akt é necessária para o deslocamento nuclear de Mdm2. Este processo ocorre no momento em que Akt fosforila as serinas 166, 186 e 188 no domínio de Mdm2, isso faz com que ocorra a migração de Mdm2 do citoplasma para o núcleo (FENG et al., 2004). A interação física entre Akt e Mdm2 promove o aumento de Mdm2 no núcleo que resultará em um aumento da degradação de p53 (FENG et al., 2004; MAYO; DONNER, 2001; MILNE et al., 2004; ZHOU et al., 2001).

A inibição de Akt bloqueia a entrada de Mdm2 no núcleo ocasionando a permanência de Mdm2 no citoplasma, onde esta proteína será degradada (MAYO; DONNER, 2001).

Diversas evidências sugerem que alterações em Akt desempenham importante papel em neoplasias malignas de humanos. Em 1992 foi relatado o primeiro envolvimento do gene Akt em carcinomas humanos demonstrando a sua amplificação e sua superexpressão em carcinomas de ovário e em linhagens celulares de cânceres de cólon e ovário. Estudos subsequentes documentaram a amplificação de Akt e/ou a superexpressão de mRNA em 10-20% dos carcinomas de

pâncreas e ovário e superexpressão de Akt2 em 40% dos carcinomas de ovário (TESTA; BELLACOSA, 2001).

A ativação de Akt resulta em eventos anti-apoptóticos e aumento da proliferação celular, eventos estes que favorecem a tumorigenese (CULLY et al., 2006; ZHOU et al., 2001).

A amplificação de Akt1 foi observada em carcinoma gástrico humano (STAAL, 1987), e a atividade de Akt1 está frequentemente aumentada em neoplasias de próstata e mama sendo inclusive relacionada a um pior prognóstico. Aumentada atividade de Akt3 foi encontrada em carcinoma de mama que apresentam alterações em receptores de estrogênio e em linhagens celulares de câncer de próstata, sugerindo que Akt3 possa contribuir para maior agressividade de neoplasias insensíveis a hormônios esteróides (TESTA; BELLACOSA, 2001).

A ativação de Akt pode ainda contribuir com a invasão tumoral/metástase por estimular a secreção de metaloproteinases (THANT et al., 2000).

O envolvimento de Akt em diversas atividades neoplásicas sugere que a ativação de Akt isoladamente pode ser suficiente para induzir o desenvolvimento neoplásico, como demonstrado no quadro 1 (TESTA; BELLACOSA, 2001).

Características dos carcinomas	Funções do Akt/ Substratos
Autonomia de estímulos para crescimento	Superexpressão de Akt pode mediar aumentada resposta a fatores de crescimento.
Insensibilidade a estímulos pró-apoptóticos.	Akt possibilita a entrada de Mdm2 no núcleo, resultando em inibição de p53. Akt induz a localização citoplasmática de p21 e p27, promovendo crescimento celular. Akt estabiliza ciclina D1 e D3.
Inibição da apoptose	Inativa fatores pró-apoptóticos como BAD e (pro)caspase-9. Ativa IKK, resultando na transcrição de NF-κB. Inativa os fatores de transcrição <i>forkhead</i> , desta forma inibindo a expressão de Faz ligante.
Ilimitado potencial de replicação	Aumento da atividade da telomerase através da fosforilação de HteRT
Manutenção da angiogênese	Akt ativa eNOS que promove a angiogênese.
Invasão tecidual e metástase	Estimula a secreção de MMP.

Quadro 2.1 - Características do câncer e as variadas funções de Akt (VARA et al.,2004)

2.6 Hsp90 (heat shock protein 90) e 17-AAG (ansamycin 17-allylaminogeldanamycin)

Um grupo de proteínas, inicialmente identificadas como proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins* – *Hsp*) são responsáveis por estabilizar e facilitar a dobra de polipeptídeos e transporte de certas proteínas relacionadas à regulação do ciclo celular, sobrevivência e apoptose (GEORGAKIS et al., 2006a; SHINTANI et al., 2006). A nomenclatura das Hsps relaciona-se a seus pesos moleculares, por exemplo, a 70kDa Hsp é denominada de Hsp70 (TOKALOV et al., 2007).

As proteínas Hsp foram primeiramente descritas em 1962 por Ritossa através de experimentos em *Drosófilas* nos quais identificou grupos de proteínas que ao serem submetidas a altas temperaturas tinham seus níveis aumentados, ao contrário de outras proteínas que exibiam diminuição dos níveis diante do aumento da temperatura (GOETZ et al., 2003). Uma das abundantes Hsps é Hsp90. Em células que não estão experimentando estresse, Hsp90 existe de forma inativa. Embora células neoplásicas e não neoplásicas expressem Hsp90, células neoplásicas sobre-expressam Hsp90 na forma ativa, além de serem mais sensíveis ao bloqueio farmacológico (GEORGAKIS et al., 2006b).

As células quando submetidas ao estresse, exposição à radiação ionizante e agentes tóxicos também respondem com o aumento da síntese de chaperonas moleculares (LEN; PERCY, 2003; TOKALOV et al., 2007). Durante condições de estresse, Hsps aumentam a sobrevivência celular protegendo proteínas que são sensíveis ao estresse, assim como ocasionando proteólise de proteínas danificadas. Na

ausência de estresse, Hsps desempenham muitas funções como ativação de proteínas regulatórias específicas, incluindo fatores de transcrição, degradam proteínas, realizam sinalização celular, apresentação de antígeno, dentre outras funções.

As proteínas Hsps formam complexos multimoleculares que atuam como chaperonas moleculares se ligando a outras proteínas denominadas de *client proteins*, de um modo ATP dependente. Estes complexos desempenham um papel regulatório da função de proteínas em diferentes locais como, por exemplo: mudanças conformacionais de proteínas no citosol, retículo citoplasmático e mitocôndria, transporte intracelular de proteínas, reparo ou degradação de proteínas parcialmente desnaturadas pela exposição ao estresse oxidativo e controle de proteínas regulatórias (GOETZ et al., 2003; KOGA et al., 2006).

Células de uma grande variedade de neoplasias mostram níveis de expressão atípicos de um ou mais tipos de Hsp. A literatura vem sugerindo o uso de Hsps como biomarcadores, a exemplo do que ocorre em pacientes com câncer de mama ou câncer gástrico que tem a superexpressão de Hsps associada a um pior prognóstico (JOLLY; MORIMOTO, 2000). Hsp90 está envolvida nas características fenotípicas malignas, incluindo invasão, angiogênese e metástase. Além disso, proteínas associadas com resposta à radiação como Akt e Raf-1 e outras relacionadas à sinalização oncogênica como ErbB2, quinases da família Src e p53 mutado são clientes de Hsp90 (KOGA et al., 2006; SHINTANI et al., 2006).

As chaperonas moleculares, em mamíferos, são divididas em vários grupos de acordo com seu peso molecular. As principais famílias presentes em células humanas são: Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp27 e Hsp10 (CALDERWOOD et al., 2006; GOETZ et al., 2003; JOLLY; MORIMOTO, 2000).

A mais abundante chaperona molecular em eucariotas é a proteína Hsp90. Esta chaperona molecular é indispensável para a estabilização de frágeis estruturas presentes em receptores, proteínas quinase e fatores de transcrição. Hsp90 atua como um facilitador de um rápido fluxo de respostas celulares a estímulos extracelulares (CALDERWOOD et al., 2006). Em humanos existem duas isoformas de Hsp90, ambas localizadas no citoplasma, são elas Hsp90 α e Hsp90 β . As duas isoformas são ativadas por estresse celular e, até o momento, não foram identificadas diferenças em suas atividades (GOETZ et al., 2003; LEN; PERCY, 2003).

Hsp90 é um homodímero fosforilado formado por duas ou três ligações covalentes em cada monômero. Hsp90 contém um conservado domínio ATP em sua porção N-terminal, sendo a hidrólise de ATP necessária para sua ativação. Um segundo sítio recentemente descrito e por isso de função ainda desconhecida, está localizado na porção C-terminal da proteína Hsp90 (GOETZ et al., 2003).

Quando o domínio ATP de Hsp90 é ativado ocorre alteração conformacional desta proteína favorecendo a interação entre Hsp90 e as *client proteins* e co-chaperonas (GOETZ et al., 2003).

Hsp90 é uma chaperona molecular importante devido ao seu amplo número de *client proteins* e em razão destas estarem envolvidas na sinalização celular, proliferação e sobrevivência. O processo de transformação neoplásica envolve a superexpressão ou mutação de muitas proteínas Hsp90-dependentes. Por estes motivos Hsp 90 tornou-se alvo fundamental da terapia anti-câncer (GOETZ et al., 2003).

As duas isoformas de Hsp90 estão superexpressas em neoplasia de mama, pulmão, linfomas, leucemias, doença de Hodgkin's e carcinoma epidermóide de

boca (GEORGAKIS et al., 2006a; JOLLY; MORIMOTO, 2000; SHINTANI et al., 2006).

Dentre as *cliente proteins* que são alvo de Hsp90 é importante destacar p53 mutante e Akt (CALDERWOOD et al., 2006; GOETZ et al., 2003; LEN; PERCY, 2003). Os níveis aumentados de chaperonas moleculares potencializam a atividade de proto-oncogenes, como ocorre com p53 mutante que interfere com o mecanismo de sinalização estresse-associado resultando em diminuição de apoptose (JOLLY; MORIMOTO, 2000).

p53 encontra-se mutada ou ausente em aproximadamente metade de todos os cânceres humanos. Pesquisas demonstram que p53 mutada, para adquirir sua nova conformação, necessita de interação transitória com Hsp90. As terapias anti-câncer que apresentam como alvo a proteína Hsp90 proporcionam a desestabilização de p53 mutada e aumento dos níveis de p53 selvagem (BLAGOSKLONNY et al., 1996; GOETZ et al., 2003; SHINTANI et al., 2006).

Basso, Zheng e Drobnyak (2002) recentemente descreveram a associação entre Akt e Hsp90 ao demonstrarem, em células provenientes de câncer de mama, que a inibição de Hsp90 por 17-AAG resulta em marcante redução da meia-vida da proteína Akt.

Inúmeras pesquisas mostram a importância de Akt na carcinogênese por esta proteína estimular a proliferação neoplásica e inibir a apoptose, estando Akt freqüentemente ativado em células tumorais. Nessa linha de pensamento, a inibição de Hsp90 resulta em redução da meia-vida de Akt e apoptose de células neoplásicas (BASSO; ZHENG; DROBNJAK, 2002).

Torna-se difícil a abordagem de um alvo específico responsável pelo processo de carcinogênese em razão do grande número de vias de sinalização

envolvidas e da freqüente interação que ocorre entre estas vias. Uma nova substância denominada de 17-AAG (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin) representa uma classe de medicamento capaz de afetar múltiplos alvos presentes nas vias de sinalização envolvidas na proliferação e sobrevivência celular. Este tipo de medicamento é caracterizado por sua específica habilidade de ocupar nucleotídeos em Hsp90 onde ocorrer a interação com ATP, afetando profundamente a estrutura da chaperona (SHINTANI et al., 2006). Outra forma de inibição proporcionada por 17-AAG deve-se à sua ligação à Hsp90 em locais de ligação de diversas proteínas *client* oncogênicas (GOETZ et al., 2003).

17-AAG é a primeira droga em sua categoria que está sendo testada em pesquisas clínicas, sendo bem tolerada por pacientes e com baixa toxicidade (GOETZ et al., 2003; GOETZ et al., 2005; NECKERS; LEE, 2003).

17-AAG é um análogo da geldamicina, porém apresenta menor toxicidade e maior estabilidade (GOETZ et al., 2003).

Hsp90 está presente tanto em células normais quanto em células neoplásicas e 17-AAG apresenta 100 vezes mais afinidade por Hsp90 de células neoplásicas, resultando em eficiente atividade anti-proliferativa nestas células (NECKERS; LEE, 2003; GEORGAKIS et al., 2006a). A maior afinidade de 17-AAG com Hsp90 de células neoplásicas se deve ao fato de que nestas células Hsp90 forma maior quantidade de complexos-chaperona do que quando comparado com Hsp90 de células normais que se apresenta em maior quantidade na forma livre (NECKERS; LEE, 2003).

3 PROPOSIÇÃO

1. Avaliar, após o uso de EGF, a expressão das proteínas PTEN, Akt, Mdm2 e p53 em quatro linhagens celulares de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (HN6, HN19, HN30 e HN31) e em uma linhagem de queratinócito imortalizado (HaCat).
2. Avaliar a expressão das proteínas PTEN, Akt, Mdm2 e p53 após o uso de 17-AAG nas linhagens de células de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (HN6, HN19, HN30 e HN31) e na linhagem de queratinócito imortalizado (HaCat).
3. Comparar a expressão das proteínas PTEN, Akt, Mdm2 e p53 entre as linhagens de células neoplásicas supracitadas e da linhagem de queratinócito imortalizado (HaCat) após serem submetidas à ação de EGF e de 17-AAG.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo Celular

Para realização da pesquisa foram utilizadas quatro linhagens celulares de carcinoma epidermóide (HN6, HN19, HN30 e HN31) e uma linhagem de queratinócitos imortalizados (HaCat). As células foram plaqueadas em frascos de 25cm² contendo 5 ml de DMEM (meio essencial mínimo modificado por Dulbecco - Sigma® Chemical Co., St. Louis, MO – USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®, Campinas, SP, BR) e 0,1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma®) e mantidas em incubadora (Precision® Scientific, Winchester, West Virginia, USA) à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Todos os procedimentos do cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura utilizados. O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido de fase (Zeiss® - Axiovert 25- Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha) e o meio de cultura trocado de acordo com o metabolismo celular.

Após ocuparem 70% do frasco (subconfluência) as células foram subcultivadas. O meio de cultura foi removido e a monocamada celular lavada com solução salina tamponada com sais de fosfato (solução PBS), pH 7,4. Em seguida, as células foram separadas com 1ml de solução de tripsina (Sigma®) a 0,25% com EDTA 1mM (Sigma®) durante 5 minutos, a 37°C. A seguir, a tripsina foi inativada com o soro fetal bovino contido no meio de cultura reservado anteriormente, e as células em

suspensão transferidas para um tubo de centrifugação e centrifugadas por três minutos, à temperatura ambiente. Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspendido em 1 ml de meio de cultura. Alíquotas da suspensão foram distribuídas em frascos de cultivo de 25 cm² contendo 5 ml de meio de cultura, e novamente levadas à estufa, onde cada procedimento deste originou uma nova passagem de linhagem celular.

Todos os experimentos foram realizados em três grupos: a) grupo controle, no qual não houve aplicação de substâncias estimulantes ou inibidoras do crescimento celular; b) grupo de células estimuladas à proliferação, com aplicação de EGF (10ng/ml); c) grupo de células tratadas com 17-AAG (2μM).

Cada procedimento foi realizado com cinco amostras de cada grupo.

4.2 Indução da proliferação celular

Depois de cultivadas sobre placas de vidro, as células passaram por 24 horas de privação de soro e em seguida foram tratadas com EGF (10ng/ml) por 18 horas para que houvesse aumento da proliferação celular

4.3 Uso do 17-AAG

Para inibição da proliferação celular foi utilizado tratamento com 17-AAG (2μM)

por 24 horas após a realização de 24 horas de deprivação de soro.

Para a determinação da dosagem de 17-AAG a ser utilizada houve a comparação das curvas de crescimento e de apoptose das linhagens estudadas.

O Kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection* (San Diego, CA) foi utilizado através de imunofluorescência para que houvesse a distinção entre apoptose e necrose celular.

4.4 Contagem celular

Foi realizada a contagem prévia do número de células cultivadas em meio DMEM, utilizando-se a câmara de Neubauer. Os frascos foram plaqueados com 10^4 células e os indutores EGF e 17-AAG foram aplicados separadamente nos frascos, sendo então realizadas contagens do número de células viáveis para posterior realização das curvas de crescimento celular como forma de comparação dos níveis de proliferação celular entre o grupo controle e os grupos tratados. As contagens foram realizadas em três momentos: 24h, 48h e 72 h e todos os experimentos feitos em cinco amostras de cada linhagem.

4.5 Teste de viabilidade celular

O experimento foi realizado, em cinco amostras de cada linhagem, em uma placa de ELISA (96 poços), repetindo o mesmo medicamento, número de células

plaqueadas e tempo de tratamento, utilizados para a contagem celular com a câmara de Neubauer. As células foram cultivadas em 200µl de meio por 24 horas, submetidas a período de deprivação de soro fetal bovino e em seguida foram realizados os tratamentos com EGF e 17-AAG. Após cada tempo de tratamento, foi realizado o teste de viabilidade celular com o *Kit Cell Titer 96* (Promega, madison, Wisconsin, USA). Em cada poço foram aplicados 20µl da solução *Cell Titer 96*, seguindo incubação por 180 min em estufa de CO₂ a 37°C. Esta reação é baseada na conversão celular do sal tetrazolium (MTT) em formazam azul. A leitura da densidade óptica é proporcional ao número de células viáveis, e foi realizado um aparelho de ELISA (ELX 800 Bio-Tek instruments Inc.) com filtro de 490nm.

4.6 Imunofluorescência

O cultivo celular foi realizado em placas de 6 poços, contendo uma lamínula de vidro estéril. O experimento foi realizado no grupo controle, no grupo tratado com EGF e no grupo tratado com 17-AAG. As lamínulas foram lavadas duas vezes com solução PBS e fixadas na própria placa com metanol por 6 minutos a temperatura de - 20°C. O bloqueio foi feito com PBS/BSA 1% por 30 minutos. O anticorpo primário anti-rabbit pAkt 1:50 (Santa Cruz®), anti-mouse PTEN 1:100 (Santa Cruz®), anti-mouse p53 1:100 (Santa Cruz®) ou anti-mouse Mdm-2 1:100 (Santa Cruz®) foi diluído em PBS/BSA 1% e incubado (50µl) por 1 hora. Após nova lavagem, foi realizada incubação com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína com diluição de 1:50 por 1 hora (Amershan).

As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com meio de montagem (Vectashild, Vector Lab, CA, USA), analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha).

As reações de imunofluorescência foram realizadas com controles positivos para cada anticorpo.

A apoptose celular foi identificada com o kit Annexin V (Santa Cruz®). O tampão fornecido no Kit foi diluído 10 X em água destilada (10 µl do tampão em 90 µl de água). Após o tratamento com 17-AAG as células foram lavadas com PBS e incubadas com o tampão do Kit e 5 µl de anexina por 30 minutos. Transcorrido o tempo foi utilizado 10µl de iodeto propídio. A reação permaneceu por 30 min abrigada de luz. Após nova lavagem a lamínula foi montada e visualizada de acordo com o protocolo da imunofluorescência.

4.7 Extração e quantificação de proteínas

Após a subconfluência (70% da área cultivável), foi realizado o tratamento com EGF e 17-AAG separadamente. O meio de cultura foi removido, as células lavadas com PBS e colocadas sobre o gelo (4°C). Foi adicionado em cada placa 0,5 ml de tampão RIPA⁺ (10 mM Tris HCl pH 7,5; 10mM desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2µg/ml aprotinina, 2µg/ml pepstatina, 1Mm PMSF) com o qual as células foram incubadas por 10 minutos, a 4°C, sob agitação. As células foram raspadas da placa, a amostra obtida foi centrifugada na velocidade de 15000 RPM por 15 minutos. Em seguida o sobrenadante foi coletado e estocado a -

80 °C.

As proteínas do lisado foram quantificadas com o kit BCA Protein Assay Kit da Pierce®. A quantificação foi realizada em um aparelho de ELISA (ELX 800 Bio-Tek Instruments, Inc.) em placas de 96 poços contendo 200µl de BCA, além de 25 µl de cada lisado ou 25 µl de BSA, nas concentrações indicadas pelo fabricante, para realização da curva padrão. A leitura foi realizada com filtro de 562nm.

4.8 Western blot

As amostras foram aliqüotadas do lisado, previamente quantificado, de forma a conterem 20µg de proteína total. Foi adicionado a cada uma das amostras 5µl de tampão e seus volumes igualados. Em seguida, as amostras foram aquecidas por 5 minutos à 95°C e então submetidas a SDS-PAGE, sendo feita eletroforese a 110V por 180 minutos, em gel de acrilamida a 10%. O padrão de peso molecular utilizado foi o *Kaleidoscope Prestained Standards* (BioRad).

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) foi realizada por eletro-transferência, em cuba especial (Amersham mini VE), na qual foi utilizado o tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3). A transferência foi executada a 30 mA por 16 horas. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio.

Para a imunorreação, o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com a utilização de solução contendo 5% de leite em pó desnatado diluído em TBST, pelo período de 2 horas. Nas membranas utilizadas para o estudo de pAkt o bloqueio foi realizado com a solução TBST/BSA, por 2 horas, em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, as soluções de bloqueio foram removidas lavando-se a

membrana com TBST.

Os anticorpos primários anti-rabbit pAkt 1:50 (Santa Cruz®), anti-mouse PTEN 1:100 (Santa Cruz®), anti-mouse p53 1:100 (Santa Cruz®) e anti-mouse Mdm-2 1:100 (Santa Cruz®) foram diluídos em solução de bloqueio e aplicados de acordo com o tempo recomendado pelo fabricante, mantendo-se as membranas à temperatura ambiente sob agitação.

Lavagens para remoção do anticorpo não-absorvido foram realizadas com TBST, sob agitação e à temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi também diluído em solução de bloqueio e aplicado por 1 hora, e depois removido com TBST.

Para detecção colorimétrica o kit Opti-4CN (Bio-Rad) foi empregado na quantidade de 0,25ml para cada cm² de membrana. O período de revelação foi de 30 minutos.

Ao término do processo as membranas foram lavadas e, após secagem, foram analisadas pelo *software ImageJ.exe* e os gráficos realizados pelo *software Microsoft Excel*.

5 RESULTADOS

Para realização deste estudo as linhagens celulares foram divididas em três grupos: grupo controle, grupo de células submetidas à ação de EGF e grupo de células tratadas com 17-AAG.

5.1 Cultura de células submetidas à ação do EGF

Neste grupo experimental, as linhagens HaCat, HN6, HN19, HN30 e HN31 foram submetidas à ação do EGF(10ng/ml) durante 18h após prévia deprivação de soro por 24h.

5.1.1 PTEN

As reações de imunofluorescência revelaram marcação citoplasmática de PTEN em todas as linhagens celulares do grupo controle (Figuras 5.1a, 5.1b, 5.1c, 5.1d, 5.1e). Quando as células foram submetidas a tratamento com EGF a marcação permaneceu citoplasmática (Figuras 5.1f, 5.1g, 5.1h, 5.1i, 5.1j).

A quantificação da proteína PTEN, realizada pela técnica de western blot indicou pequeno aumento desta proteína nas linhagens HaCat (Figura 5.2), HN6 (Figura 5.3) e HN30 (Figura 5.4) quando estas foram submetidas à ação do EGF. A

linhagem HN19 (Figura 5.5), sob ação do EGF, mostrou mais significativo aumento da expressão de PTEN. A única linhagem que demonstrou diminuição quantitativa de PTEN foi HN31 (Figura 5.6).

5.1.2 p53

Todas as linhagens celulares do grupo controle exibiram marcação citoplasmática de p53 (Figuras 5.7a, 5.7b, 5.7c, 5.7d e 5.7e). Nas linhagens HN6 e HN31 a marcação fica mais forte próximo à membrana plasmática após o tratamento destas células (Figuras 5.7g e 5.7j, respectivamente). Na linhagem HN30 a presença citoplasmática de p53 é confirmada, com destaque para mais intensa imunomarcação nas células tratadas com EGF (Figura 5.7i).

Foi observado, na linhagem de queratinócito imortalizado, que as células em mitose apresentavam marcação nuclear de p53.

Os resultados de western blot indicaram aumento significativo de p53 nas linhagens HaCat (Figura 5.2), HN6 (Figura 5.3), HN30 (Figura 5.4) com destaque para HN19 (Figura 5.5) que demonstrou mais expressivo aumento. A linhagem HN31 (Figura 5.6) apresentou discreta queda dos níveis de p53.

5.1.3 Mdm2

A localização citoplasmática de Mdm2 foi confirmada por imunofluorescência em todas as cinco linhagens celulares estudadas, tanto no grupo controle (Figuras

5.8a, 5.8b, 5.8c, 5.8d e 5.8e) quanto no grupo tratado com EGF (Figuras 5.8f, 5.8g, 5.8h, 5.8i e 5.8j).

Não houve, em nenhuma das linhagens, alteração significativa dos níveis de Mdm2 após o tratamento com EGF, como demonstrado pela técnica de western blot (Figuras 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 e 5.6).

5.1.4 Akt

A única proteína que apresentou forte presença nuclear em todas as linhagens foi pAkt (Figuras 5.9a, 5.9b, 5.9c, 5.9d, 5.9e, 5.9f, 5.9g, 5.9h, 5.9i e 5.9j).

Nas linhagens HN30 e HN31 houve perceptível aumento de Akt após o uso de EGF (Figuras 5.4 e 5.6). Nas outras linhagens a técnica de western blot não apontou variação importante dos níveis desta proteína (Figuras 5.2, 5.3 e 5.5).

5.2 Cultura de células submetidas à ação do 17-AAG

Neste segundo grupo experimental, as diferentes linhagens de carcinoma epidermóide e a linhagem de queratinócito imortalizado foram submetidas à ação do 17-AAG (2 μ M) durante 24h após prévia deprivação de soro por 24h.

5.2.1 PTEN

As reações de imunofluorescência foram negativas para as linhagens HN6 e HN19 (Figuras 5.1l e 5.1m). Nas demais linhagens não ocorreu mudança na localização citoplasmática de PTEN (Figuras 5.1k, 5.1n e 5.1o).

Os testes de Western blot comprovaram a ausência de PTEN nas linhagens HN6 e HN19 (Figuras 5.3 e 5.5). Nas linhagens HaCat e HN30 foi observada intensa diminuição dos níveis de PTEN e na linhagem HN31 houve discreto decréscimo dos níveis desta proteína (Figuras 5.2, 5.4 e 5.6, respectivamente).

5.2.2 p53

Nas linhagens HaCat, HN6, HN19 e Hn30 não foi detectada imunomarcação de p53 através do método de fluorescência (Figuras 5.7k, 5.7l, 5.7m, 5.7n e 5.7o). A ausência desta proteína foi comprovada pela técnica de western blot (Figuras 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5). A linhagem HN31 demonstrou discreto aumento dos níveis de p53 (Figura 5.6).

5.2.3 Mdm2

As linhagens HaCat, HN6 e HN19 apresentaram a mesma localização citoplasmática de Mdm2 (Figuras 5.8k, 5.8l, 5.8m), todavia, nas linhagens HN30 e HN31 não foi detectada a presença de Mdm2 por imunofluorescência (Figuras 5.8n e 5.8o).

Na avaliação por western blot foi confirmada a ausência de expressão de Mdm2 nas linhagens HN30 e HN31 (Figuras 5.5 e 5.6), e intenso decréscimo dos níveis de Mdm2 nas demais linhagens (Figuras 5.2, 5.3 e 5.4).

5.2.4 Akt

As reações de imunofluorescência indicaram a localização nuclear de Akt nas linhagens HN6, HN19 e HN31 (Figuras 5.9l, 5.9m e 5.9o). Nas linhagens HaCat e HN30 não foi detectada a presença de Akt (Figuras 5.9k e 5.9n).

A ausência de Akt nas linhagens HaCat e HN30 foi novamente confirmada por western blot (Figuras 5.2 e 5.5), que indicou ainda uma perceptível diminuição dos níveis de Akt nas outras linhagens avaliadas (Figuras 5.3, 5.4 e 5.6).

Figura 5.1 - Localização da proteína PTEN nas células dos grupos controle, EGF e 17-AAG

Figura 5.2 - Expressão das proteínas estudadas em Western blot

Figura 5.3 - Expressão das proteínas estudadas em Western blot

Figura 5.4 - Expressão das proteínas estudadas em Western blot

Figura 5.5 - Expressão das proteínas estudadas em Western blot

Figura 5.6 - Expressão das proteínas estudadas em Western blot

Figura 5.7 - Localização da proteína p53 nas células dos grupos controle, EGF e 17-AAG

Figura 5.8 - Localização da proteína Mdm2 nos grupos controle, EGF e 17-AAG

Figura 5.9 - Localização da proteína Akt nos grupos controle, EGF e 17-AAG

6 DISCUSSÃO

Este trabalho se propôs a analisar a expressão das proteínas Mdm2, Akt, p53 e PTEN em quatro linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HN19, HN6, HN30 e HN31) e em uma linhagem celular de queratinócito imortalizado (HaCat) sob ação do fator de crescimento epidermal (EGF) e do quimioterápico 17-AAG que atua em uma chaperona chamada Hsp90, responsável por estabilizar Akt. Os resultados mostraram que a linhagem HaCat sob ação de EGF exibiu um aumento da expressão das proteínas Akt e p53, enquanto os níveis de PTEN e Mdm2 mostraram pequena variação. Após a utilização da substância 17-AAG a linhagem HaCat exibiu completa inibição da expressão de Akt e p53, com significativa diminuição da expressão de PTEN e de Mdm2. A linhagem HN19 sob estímulo de EGF exibiu aumento da expressão das proteínas Akt, PTEN, p53 e diminuição na expressão de Mdm2. Já após a utilização de 17-AAG a linhagem HN19 apresentou redução da expressão de Akt e Mdm2 e completa interrupção da expressão de PTEN e p53.

Os resultados, ainda, mostraram que a linhagem neoplásica HN30 sob tratamento com EGF apresentou um incremento nos níveis das proteínas Akt, PTEN e p53 e pouca variação nos níveis de Mdm2. Quando a substância 17-AAG foi utilizada na linhagem HN30 se notou completo bloqueio da expressão da proteína Akt, Mdm2 e p53 e diminuição da expressão de PTEN. A linhagem HN31 exibiu o seguinte comportamento, após a utilização do EGF: aumento da expressão da proteína Akt, diminuição da expressão de PTEN, enquanto os níveis de expressão de p53 e Mdm2 não demonstraram alterações dignas de nota. Após a utilização de

17-AAG a linhagem celular neoplásica HN31 exibiu completo bloqueio da expressão de Mdm2 e diminuição dos níveis de Akt e PTEN, enquanto a proteína p53 teve sua expressão aumentada. Finalmente, a linhagem HN6, quando tratada com EGF, mostrou aumento dos níveis de Akt e p53, enquanto os níveis de PTEN e Mdm2 não mostraram alterações de expressão importantes. Após serem submetidas a ação do quimioterápico 17-AAG, a linhagem HN6 exibiu pequena diminuição da expressão de Akt, diminuição de expressão de Mdm2 e completa interrupção da expressão das proteínas PTEN e p53.

Os resultados obtidos na linhagem de queratinócitos imortalizados (HaCat), após o uso de EGF, sugerem que o aumento observado nos níveis da expressão da proteína PTEN se deva a uma tentativa celular de controlar o incremento da expressão da proteína Akt. Embora a diminuição dos níveis de Mdm2, em relação ao grupo controle, após o uso de EGF, seja pequena, parece-nos lícito afirmar que este decréscimo associado ao pequeno aumento da expressão de PTEN contribuíram, em conjunto, para proporcionar um aumento significativo nos níveis de p53. Essas assertivas são corroboradas pela localização celular dessas proteínas, verificadas através de imunofluorescência. A ação do quimioterápico 17-AAG na linhagem HaCat mostrou-se extremamente eficaz, uma vez que proporcionou uma completa interrupção da expressão da proteína Akt associada a uma diminuição significativa dos níveis de Mdm2, proteína alvo de Akt e responsável por realizar o bloqueio das funções apoptóticas da proteína p53. A completa inibição da expressão da proteína p53, após a utilização da 17-AAG, em parte, pode ser explicada pela ausência dos estímulos proliferativos patrocinados pela proteína Akt, e também pela impossibilidade da proteína PTEN de interagir e

promover a transcrição da proteína p53, uma vez que a imunofluorescência mostrou localização de PTEN exclusivamente no compartimento citoplasmático.

Rakitina, Vasilevskaya e O'Dwyer (2007) investigaram a ação das substâncias 17-AAG e oxaliplatina em linhagens celulares de carcinomas de cólon desprovidas da expressão de p53. Os autores inferiram que a apoptose pela via intrínseca apresentava-se aumentada, enquanto a via extrínseca não era estimulada quando os dois quimioterápicos eram utilizados. Investigações futuras necessitam ser realizadas para observar se esses efeitos observados na apoptose das células de carcinoma de cólon submetidas a ação de 17-AAG, podem ser extrapolados para a linhagem HaCat que também exibiu perda da expressão de proteína p53.

A linhagem HaCat é representada por queratinócitos imortalizados, o que sugere, por não terem comportamento neoplásico totalmente estabelecido, que sofreram poucas mutações. Em função do exposto, os resultados ratificaram a importante ação de 17-AAG sobre a inibição da proteína Akt nessa linhagem celular.

Nossos resultados, também, mostraram a elevação da expressão da proteína Akt nas células HN6, provenientes de carcinomas de língua, após serem submetidas aos efeitos estimulantes de EGF, confirmando o valor da participação dessa proteína no processo de carcinogênese bucal. Os níveis da proteína PTEN tiveram um pequeno acréscimo, talvez fruto da tentativa celular de conter o aumento dos níveis da proteína Akt. O aumento da expressão da proteína p53, após aplicação de EGF não parece ser consequência da diminuição da degradação patrocinada por Mdm2, uma vez que não foi observada redução dos níveis de Mdm2, quando comparadas ao grupo controle. Como p53 e PTEN, após análise da imunofluorescência, apresentaram localização citoplasmática, não parece que o aumento da expressão da proteína p53 seja em função do aumento da expressão de PTEN. Nessa linha de

pensamento convém mencionar que PTEN interage fisicamente com p53 somente no núcleo, modulando sua atividade transcricional e bloqueando sua degradação (TROTMAN; PANDOLFI, 2003).

Importante ressaltar que a análise da imunofluorescência, das células HN6, após ação de EGF, mostrou a presença tanto da proteína p53 como da proteína Mdm2 exclusivamente citoplasmática. Mdm2 fosforilada por Akt liga-se fortemente a proteína p300 e fracamente a p19ARF no núcleo e ao conduzir p53 ao citoplasma regula sua degradação (ZHOU et al., 2001). Como, neste estudo, não foi analisado o nível de Mdm2 que se encontrava associado a p53 no ambiente citoplasmático, não se pode concluir qual o papel de Mdm2 e p53 citoplasmáticos. Diante do exposto, parece-nos correto sugerir que a proteína Akt no desenvolvimento celular da linhagem HN6, submetidas à ação de EGF, utiliza outras vias que independem da participação das proteínas p53 e Mdm2.

Após serem submetidas à ação do quimioterápico 17-AAG, as células HN6 mostraram-se pouco sensíveis. Essa assertiva baseia-se na análise dos níveis de expressão da proteína Akt e do bloqueio completo da expressão das proteínas PTEN e p53. Esses resultados avaliados em conjunto mostram que esta linhagem celular mantém o comportamento proliferativo, em função dos níveis de expressão de Akt, além de aumentar suas propriedades anti-apoptóticas, em decorrência da inibição completa das proteínas pró-apoptóticas PTEN e p53. Interessante nesse momento ressaltar a afirmação de Mayo e Donner (2001): "... a ausência de PTEN funcional ou sobre-expressão da via PI3K/Akt permite a perda da atividade da proteína p53, com conseqüente inabilidade da célula neoplásica de responder aos danos no DNA com apoptose".

A linhagem HN19 é proveniente de células neoplásicas localizados em linfonodos. Após serem estimuladas com o fator de crescimento, essas células exibiram um acréscimo na expressão de PTEN bem maior que o aumento observado para a proteína Akt. O aumento da expressão da proteína p53 não parece ser resultado direto do aumento da expressão da proteína PTEN, pois sua localização, investigada por imunofluorescência, foi exclusivamente citoplasmática, inviabilizando a interação nuclear de p53 com PTEN. Porém o aumento da expressão de p53 pode ser resultado da diminuição da expressão da proteína Mdm2. A análise desses resultados sugere que essa linhagem metastática possui uma menor dependência da ação estimulante de EGF para o seu crescimento. Convém citar o estudo de Vestey et al. (2005), em neoplasias de mama e próstata, que concluíram que em algumas neoplasias a proteína Akt teria importância mais marcante na iniciação do que na progressão tumoral. Posteriores estudos devem ser direcionados para a verificação da função das proteínas PTEN e p53, sabidamente detentoras de atividades anti-angiogênicas e anti-apoptóticas, na linhagem HN19, uma vez que o aumento de suas expressões não está, necessariamente, vinculada ao aumento das funções dessas proteínas, uma vez que proteínas truncadas não funcionais podem ser geradas por mutações.

Após serem colocadas sob ação do quimioterápico 17-AAG, as células neoplásicas HN19 exibiram uma pequena diminuição em sua capacidade proliferativa, pela discreta diminuição da expressão de Akt, porém tais células exibiram uma significativa redução na capacidade de promover morte celular programada, evidenciada pelo completo bloqueio da expressão das proteínas PTEN e p53. Convém mencionar, entretanto, que a visão de que a apoptose representa o mais relevante mecanismo pelo qual células neoplásicas são mortas não se aplica a

todas as drogas citotóxicas. Células com reduzida capacidade apoptótica e que sofrem excessivo dano ao DNA morrem por necrose, o que equivale dizer por morte celular mediada por depleção de ATP. Digno de nota, que não há relatos na literatura afirmando que o quimioterápico 17-AAG, quando usado isoladamente, promova necrose (RAKITINA; VASILEVSKAYA; O'DWYER, 2007). Após esses comentários, parece-nos lícito sugerir que a linhagem HN19 é resistente a morte celular, por apoptose ou por necrose, induzida por 17-AAG.

A linhagem HN30 é proveniente de carcinoma epidermóide de faringe. O aumento da expressão da proteína PTEN, após tratamento com EGF, pode ser interpretado como uma tentativa de equilibrar a expressão aumentada da proteína Akt. A expressão aumentada da proteína p53, quando comparadas ao grupo controle, não foi fruto da diminuição da ação de degradação por Mdm2, uma vez que os níveis de Mdm2 não sofreram variações. Como a imunofluorescência exibiu localização exclusivamente citoplasmática de PTEN, o que impossibilita a interação com p53, níveis aumentados de PTEN também não justificam o acréscimo da expressão de p53. Esses dados analisados em conjunto nos permitem sugerir que a proteína Akt nas HN30 promove resistência a apoptose por mecanismos que não envolvem as proteínas Mdm2 e p53. Seguindo essa linha de raciocínio, convém lembrar que outros substratos de Akt como a proteína BAD, caspase 9, proteína FLIP (do inglês FLICE-inhibitory protein) e dos fatores de transcrição da família forkhead FKHR e FKHL1 são promotores de morte celular e inibição desses alvos promove sobrevivência (BROGNARD et al., 2001; BRUNET et al., 1999; GRILLE et al., 2003; HU et al., 2005; LUO; MANNING; CANTLEY, 2003; VASQUEZ; SALLES, 2005).

As células HN30 após sofrer ação da substância 17-AAG exibiram completa inibição da expressão das proteínas Akt, Mdm2 e p53. Como houve completa inibição da proteína Mdm2 e discreta diminuição de PTEN, o total bloqueio de p53 pode ter sido realizado por proteínas que degradam p53 de maneira independente de Mdm2, como Pirh2 e COP1 (ESSER; SCHEFFNER; HÖHFELD, 2005). A indução de apoptose promovida por 17-AAG, se houver, estabelece-se por mecanismos independentes da participação da proteína p53. Rakitina, Vasilevskaya e O'Dowyer (2007) mencionaram que 17-AAG promove citotoxicidade por diminuir os sinais anti-apoptóticos provenientes da transcrição de NF- κ B. Resultados similares aos encontrados nas HN30 após tratamento com 17-AAG foram encontrados por Georgakis et al. (2006b) em células de linfoma de grandes células anaplásicas após utilizarem 17-AAG. Nesse estudo, os autores constataram além da queda dos níveis de Akt, desfosforilação da proteína ERK e baixa regulação de ciclina D1, CDK4 e CDK6.

A linhagem HN31 é proveniente de linfonodos. Após a estimulação promovida por EGF houve aumento da expressão da proteína Akt, confirmando o papel desempenhado por esta proteína na proliferação desta linhagem celular. Os níveis de PTEN tiveram uma redução significativa, enquanto a expressão de p53 apresentou somente uma atenuação, sinalizando que a interação da proteína PTEN com a proteína p53 parece ocorrer em pequena medida nessa linhagem celular. Freeman, Wu e Levine (2003) justificam a razão de mutações simultâneas de p53 e PTEN serem eventos incomuns. Segundo os autores, perda de PTEN acontece em estádios diferentes das que ocorrem com p53 durante a progressão do câncer e por estímulos diferentes.

As células neoplásicas HN31 quando submetidas à ação da 17-AAG exibiu pequena redução da expressão da proteína Akt sugerindo reduzida eficiência do quimioterápico em controlar a proliferação através dessa proteína. A expressão de Mdm2 foi totalmente suprimida, o que provavelmente contribui para o aumento da expressão da proteína p53.

Em síntese ficou bem estabelecido, após a análise dos resultados de estimulação com EGF, que todas as linhagens celulares promovem seu crescimento por aumento da expressão da proteína Akt. A imunofluorescência comprovou que a localização da proteína Akt foi exclusivamente nuclear. Após ativação pAkt β , libera-se da superfície interna da membrana plasmática e passa a se localizar no núcleo dentro 20 a 30 minutos após ativação por fatores de crescimento, indicando que alguns alvos da proteína Akt, que controlam a progressão do ciclo celular e apoptose podem estar localizados no núcleo, porém sua exata função nuclear permanece desconhecida (ANDJELKOVIC et al., 1997; DAVID et al., 2004; JENSEN; HUNTER, 2001; MEIER et al., 1997). Feng et al. (2004) sugerem que após ser ativado PKB migra para o núcleo e posteriormente fosforila Mdm2 no compartimento nuclear. As proteínas Akt1 e Akt2 parecem ter similares substratos in vivo, entretanto, as funções fisiológicas podem não ser as mesmas, uma vez que os níveis de ativação e especificidade celular são diferentes (ARBOLEDA et al., 2003).

Koga et al. (2006) estabeleceram que o bloqueio da chaperona Hsp90, em certas circunstâncias, pode promover sobrevida e/ou progressão do câncer através do aumento na ativação de Akt. Os autores explicaram que os inibidores de Hsp90 podem ocasionar dissociação da quinase Src de seu inibidor Hsp90. Uma vez liberado, Src fosforila Cbl, o qual recruta a subunidade p85 de PI3K que posteriormente ativa a subunidade p110, resultando em ativação de PI3K e

posteriormente ativação da proteína Akt. O estudo foi realizado em células de carcinoma renal sob ação do antibiótico geldanamicina e anamicina, um inibidor de Hsp90 (GA).

Uma proteína chave na proliferação celular promovida por Akt é a ciclina D1. Já está bem demonstrado que o aumento da expressão de Akt está acompanhado do acréscimo dos níveis de ciclina D1, após tratamento com EGF, nas linhagens investigadas em nosso estudo (HN30, HN31, HN19, HN6 e HaCat) (SALLES, 2005).

Outro resultado, que merece destaque, é o aumento da expressão das proteínas p53 e PTEN observado em quatro das cinco linhagens, exceção da HN31, submetidas à ação estimulante de EGF, sugerindo que as células neoplásicas através de um crosstalk, já estabelecido na literatura, entre essas duas proteínas tentam compensar o aumento dos níveis da proteína Akt (FREEMAN et al., 2003; GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006; HIT, 2005; MAYO; DONNER, 2001; SIMPSON; PARSONS, 2001; STAMBOLIC et al., 2001).

Em relação à ação do quimioterápico 17-AAG, duas linhagens exibiram completa inibição da proteína Akt (HaCat e HN30) as demais linhagens exibiram pequenas reduções na expressão dessa proteína, sugerindo que as duas linhagens metastáticas HN31 e HN19 e a de língua HN6 são resistentes aos mecanismos inibitórios desse quimioterápico, uma vez que está bem estabelecido na literatura a interação da Hsp90 com a estabilidade de Akt, com seu bloqueio levando a diminuição significativa dos níveis de Akt (GEORGAKIS et al., 2006; SHINTANI et al., 2006; TOKALOV; PIECK; GUTZEIT, 2007). Yin et al. (2005), após utilizarem a substância 17-AAG em células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, encontraram uma linhagem, denominada JHU12, resistente ao quimioterápico.

Outro resultado digno de destaque foi a supressão da expressão da proteína p53 em quatro das cinco linhagens, exceção da HN31, após tratamento com 17-AAG. Somente a proteína p53 mutada exige interação com a chaperona Hsp90 para estabilizá-la (WALERYCH et al., 2004), condição encontrada somente nas linhagens HaCat e HN30. Uma possível explicação para o bloqueio da expressão nas linhagens que não possuem p53 mutada (HN6 e HN19) é fornecida por Walerych et al. (2004) que relataram que a proteína p53, produzida por um gene não mutado, também é capaz de formar complexos com Hsp90 e outras chaperonas, como consequência de uma alteração conformacional na transição da forma normal para a forma mutada.

Outra explicação para o bloqueio da expressão de p53 nas linhagens HN6 e HN19, após o tratamento com 17-AA, é dada por Esser, Scheffner e Höhfeld (2005). Esses pesquisadores relatam que a interação de p53 selvagem com Hsp90 pode ocorrer, porém a detecção pode não acontecer, em razão da natureza altamente transitória de p53 selvagem. Já a linhagem HN31 possivelmente apresentou elevação de p53 em virtude do completo bloqueio da expressão de Mdm2, proteína responsável por sua ubiquitinação.

Ainda sob à luz desses comentários, convém mencionar os resultados obtidos por Shintani et al. (2006) que trataram com 17-AAG e radioterapia em cinco linhagens de células de carcinoma epidermóide de boca. Os autores constaram que somente as linhagens que apresentavam p53 selvagem foram sensíveis à ação da terapia combinada aplicada. Tal asseveração não foi sustentada em nosso estudo, uma vez que a linhagem HN6 (de língua), que apresenta p53 selvagem, não possuiu resultado superior, após tratamento com 17-AAG, ao apresentado pela linhagem HaCat que apresenta p53 mutado. Se faz necessário lembrar, entretanto, que em

nossa investigação utilizamos 17-AAG isoladamente, sem combinar com radiação como fizeram Shintani et al. (2006).

Não há relatos na literatura, atribuindo relação da proteína Hsp90 com a estabilidade de PTEN, porém nossos resultados mostraram perda total da expressão dessa proteína em duas linhagens (HN6 e HN19) e diminuição da expressão nas demais linhagens, sugerindo interação entre Hsp90 com PTEN. Não deve ser descartada, entretanto, ser a diminuição da expressão de PTEN resultado do decréscimo dos níveis da proteína p53, uma vez que nas duas linhagens que houve completo bloqueio de expressão de PTEN, também houve perda total da expressão de p53 e na ausência de p53 são esperados baixos ou inexistentes níveis de PTEN (FREEMAN et al., 2003).

Finalmente, os níveis de Mdm2 após a utilização de 17-AAG foram suprimidos nas linhagens HN30 e HN31 e diminuição da expressão nas demais linhagens. Peng et al. (2001) relataram que em alguns tumores Mdm2 não interage com Hsp90 na ausência de p53 mutante, sugerindo que p53 funciona como elo entre Hsp90 α e Mdm2. A explicação para a perda total dos níveis de Mdm2 possivelmente se deva à perda da expressão da proteína Akt nas células HN30 (FREEMAN et al., 2003; LI et al., 2006).

7 CONCLUSÕES

1. A indução de proliferação celular realizada com EGF resultou em diminuição da expressão das proteínas Akt, PTEN, Mdm2 e p53 em todas as linhagens celulares estudadas. Digno de nota foi a diminuição da expressão de Mdm2 na linhagem HN19 e diminuição da expressão de PTEN na linhagem HN31. Estes resultados sugerem que HN31 é a linhagem que melhor responde ao estímulo proliferativo de EGF.
2. HN31, após o tratamento com 17-AAG, foi a linhagem que melhor traçou um perfil apoptótico com diminuição dos níveis de Akt, ausência de Mdm2 e aumento dos níveis de PTEN e p53.
3. Após o uso do quimioterápico 17-AAG, as linhagens celulares HN6 e HN19 continuaram apresentando níveis significativos de Akt e Mdm2, o que sugere um potencial mais agressivo devido a manutenção do comportamento proliferativo e anti-apoptótico destas linhagens.

REFERÊNCIAS¹

Adey NB. Threonine phosphorylation of the MMAC1/ PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding. *Cancer Res* 2000;60:35-7.

Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJC, et al. Role of Translocation in the Activation and Function of Protein Kinase B. *J Biol Chem* 1997;272(50):31515-24.

Antunes JLF, Biazevic MGH, Araujo ME, Tomita NE, Chinellato LEM, Stuart AG, et al. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980-1998. *Oral Oncol* 2001;37:345-50.

Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinavar FF, Bray MR, Snow BE, Vandeskay B, et al. Overexpression of Akt2/Protein Kinase B β Leads to Up-Regulation of β 1 Integrins, Increased Invasion, and Metastasis of Human Breast and Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res* 2003;63:196-206.

Basso D, Zheng F, Drobnjak M. 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces the degradation of androgen receptor and HER-2/neu and inhibits the growth of prostate cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2002;3:986-93.

Bennett WP, Hollstein MC, Metcalf RA. P53 mutation and protein accumulation during multistage human esophageal carcinogenesis. *Cancer Res* 1992;52:6092-7.

Bettendorf O, Piffko J, Bãnkfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol* 2004;40:110-9.

Blagosklonny MV, Toretsky J, Bohen S, Neckers L. Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8379-83.

Bova R, Cheung I, Coman W. Total glossectomy: is it justified? *ANZ J Surg* 2004;74:134-8.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Ministério da Saúde; Brasília:2006.

Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/Protein Kinase B Is Constitutively Active in Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Promotes Cellular Survival and Resistance to Chemotherapy and Radiation. *Cancer Res* 2001;61:3986-97.

Brooks CL, Gu W. Dynamics in the p53-Mdm2 ubiquitination pathway. *Cell Cycle* 2004;3(7):895-9.

Brooks CL, Gu W. p53 ubiquitination: Mdm2 and Beyond. *Molecular Cell* 2006;21:307-15.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt Promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96:857-68.

Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 2006;31(3):164-72.

Canto MT, Devesa S. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncol* 2002;38:610-7.

Cardinali M, Pietraszkiewicz H, Ensley JF, Robbins KC. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. *Int J Cancer* 1995;61:98-103.

Chang C, Freeman DJ, Wu H. PTEN regulates Mdm2 expression through the P1 promoter. *J Biol Chem* 2004; 279(28):29841-48.

Chen YK, Lin HLM, Lin CC. Primary oral squamous cell carcinoma: An analysis of 703 cases in Southern Taiwan. *Oral Oncol* 1998;35:173-9.

Chen Z. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of PTEN-deficient tumorigenesis. *Nature* 2005;436:725-30.

Chung KY, Mukhopadhyay T, Kim J. Discordant p53 gene mutations in primary

head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Res* 1993;53:1676-83.

Copeland RA, Lai Z. Binding of p53 to the central domain of Mdm2 is regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* 2006;281(39):28575-83.

Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Gordon BS, Walboomers JM, et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1998;184:360-8.

Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature* 2006;6:184-92.

Dai U, Shi D, Jin Y, Sun X, Zhang Y, Grossman SR, et al. Regulation of the Mdm2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism. *Am Soc Biochem Mol Biol* 2006;1:1-14.

David O, Jett J, LeBaeu H, Dy G, Hughes J, Prioth D, et al. Phospho-Akt Overexpression in Non-Small Cell Lung Cancer Confers Significant Stage Independent Survival Disadvantage. *Clin Cancer Res* 2004;10(15):6865-71.

Dubská L, Andera L, Sheard MA. HER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: An unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Letters* 2005;579:4149-58.

Durazzo MD, Araújo CE, Souza BJ, Ade OS, Takeda F, Siqueira M, et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: Increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastase. *Clinics* 2005;60(4):293-8.

Esser C, Scheffner M, Höfelfeld J. The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 2005;280(29):27443-8.

Feng J, Tamaskovic R, Yang Z, Brazil PD, Merlo D, Hess D, et al. Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279(34):35510-7.

Ferbeyre G, Stanchina E, Lin AW, Querido E, McCurrach ME, Hannon GJ, et al.

Oncogenic *ras* and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 2002;22(10):3497-508.

Freeman DA, Wu L, Levine AJ. Drug targets in the EGF signaling pathways for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:96-107.

Freeman DJ, Li AG, Wei G, Li H, Kertesz N, Lesche R, et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* 2003;3:117-30.

Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Martinez-Valdez H, Medeiros LJ, Younes A. Inhibition of heat shock protein 90 function by 17-AAG in Hodgkin's Lymphoma cells down-regulates Akt Kinase, Dephosphorylates Extracellular Signal-Regulated Kinase, and induces cell cycle arrest and cell death. *Clin Cancer Res* 2006b;12(2):584-90.

Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Younes A. The HSP90 inhibitor 17-AAG synergizes with doxorubicin and U0126 in anaplastic large cell lymphoma irrespective of ALK expression. *Experimental Hematology* 2006a;34:1670-9.

Gericke A, Munson M, Ross AH. Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene* 2006;374:1-9.

Gitali G, Bohdan W. p53-Independent functions of Mdm2. *Molecular Cancer Res* 2003;1:1027-35.

Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol* 2003;14:1169-76.

Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Stensgard B, Safgren S, Erlichman C. Phase I trial of 17-AAG in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(6):1078-87.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, Van Roy F, et al. The Protein Kinase Akt Induces Epithelial Mesenchymal Transition and Promotes Enhanced Motility and Invasiveness of Squamous Carcinoma Lines. *Cancer Res* 2003;63:2172-8.

Grossman SR. p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell* 1997;2:405-15.

Haddadin KJ, Soutar DS, Webster MHC, Robertson AG, Oliver RJ, Macdonald DG. Natural history and patterns of recurrence of tongue tumours. *Br J Plastic Surg* 2000;53:279-85.

Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 2000;77:81-137.

Hit N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* 2005;8:179-83.

Hu H, Jiang C, Li G, Lu J. PKB/Akt and ERK regulation of caspase-mediated apoptosis by methylseleninic acid in LNCap prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2005;26(8):1374-81.

Husseiny G, Kandil A, Jamshed A, Khafaga Y, Saleem M, Allam A, et al. Squamous cell carcinoma of the tongue: an analysis of prognostic factors. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000;38:193-9.

Jaber MA, Porter SR, Gilthorpe MS, Bedi R, Scully C. Risk factors for oral epithelial dysplasia- the role of smoking and alcohol. *Oral Oncol* 1999;35:151-6.

Jensen PB, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411:355-65.

Ji-Hyun C, Charis E. Nuclear-Cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res* 2005;65(18):8096-100.

Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(19):1564-72.

Kandil ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 2000;253:210-29.

Kari S, Alho O-P, Jokinen HK, Laara E. Carcinoma of the oral tongue in northern Finland: trends in overall incidence and patient and tumour characteristics. *J Oral Pathol Med* 1997;26:480-3.

Koga F, Xu W, Karpova TS, Neckers L. Hsp90 inhibition transiently activates Src Kinase and promotes Src-dependent Akt and Erk activation. *PNAS* 2006;103(30):11318-22.

Kohn KW, Pommier Y. Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the off-on switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:816-27.

Kohono T, Takahashi M, Manda R, Yokota J. Inactivation of the PTEN/MMAC1/TEP1 gene in human lung cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;22:152-6.

Lam L, Logan RM, Luke C. Epidemiological analysis of tongue cancer in South Australia for the 24-Year. *Aust Dent J* 2006;51(1):16-22.

Len N, Percy I. Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol* 2003;15:419-24.

Leslie NR, Downes PC. PTEN function: how normal cells control it and tumor cells lose it. *Biochem J* 2004;382:1-11.

Li AG, Piluso LG, Cai X, Wei G, Sellers WR, Liu X. Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN 2006;23:575-87.

Liang H, Lunec J. Characterisation of a novel p53 down-regulated promoter in intron 3 of the human Mdm2 oncogene. *Gene* 2005;361:112-8.

Lill NL, Di Cristofano A, Lunec J, Chiosis G, Cohen P, Hemmings B, et al. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* 1997;387:823-7.

Lindsey DM, Donner DB. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* 2002;27(9):462-7.

Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, et al. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58:1199-205.

Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulassuriya KAAS. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med* 2004;33:525-32.

Lunec J, Liang H. Characterisation of a novel p53 down-regulated promoter in intron 3 of the human MDM2 oncogene. *Gene* 2005;361:112-8.

Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. *Cancer Cell* 2003;4:257-62.

Ma J, Martin JD, Zhang H, Auger KR, Ho TF, Kirkpatrick RB, et al. A second p53 binding site in the central domain of Mdm2 is essential for p53 ubiquitination. *Biochemistry* 2006;45:9238-45.

Mayo LD, Donner DB. The PTEN, mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* 2001;27(9):462-7.

McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999;59:4291-96.

Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA. Mitogenic Activation, Phosphorylation, and Nuclear Translocation of Protein Kinase B β . *J Biol Chem* 1997;272(48):30491-7.

Michaloglou C, Roth R, Kohn A, Dielh F, Yao R, Kato J, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005;436:720-4.

Miller S, Lou D, Seldin D, Lane W, Neel B. Direct identification of PTEN phosphorylation sites. *FEBS Lett* 2002;528:145-7.

Milne D, Kampanis P, Nicol S, Dias S, Campbell D G, Fuller-Pace F, et al. A novel site of Akt-mediated phosphorylation in the human MDM2 onco-protein. *FEBS Letters* 2004;577:270-6.

Neckers L, Lee Y. The rules of attraction. *Nature* 2003;425:357-9.

Oki E, Tokunaga E, Nakamura T, Ueda N, Futatsugi M, Mashino K, et al. Genetic mutual relationship between PTEN and p53 in gastric cancer. *Cancer Letters* 2005;227:33-8.

Panigrahi AR, Pinder SE, Chan SY, Paish EC, Robertson JFR, Ellis IO. The role of PTEN and its signalling pathways, including Akt, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *J Pathol* 2004;204:93-100.

Peng Y, Chen L, Li C, Lu W, Chen J. Inhibition of Mdm2 by hsp90 contributes to mutant p53 stabilization. *J Biol Chem* 2001;276(44):40583-90.

Pommier Y, Kohn KW. Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the off-on switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:816-27.

Prado RF, Taveira LAA. Nicotina na carcinogênese química bucal. *Rev Bras Patol Oral* 2003;2(4):24-7.

Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, Hall A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* 2004;303:1179-81.

Rakitina TV, Vasilevskaya IA, O'Dwyer P J. Inhibition of G1/S transition potentiates oxaliplatin-induced cell death in colon cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 2007;73:1715-26.

Salles FT. Análise da expressão e mecanismos de ação da proteína Akt em células cultivadas de carcinoma epidermóide bucal humano [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP. 2005.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 2000;36(4):311-27.

Shingaki S, Takada M, Sasai K, Bibi R, Kobayashi T, Nokura T, et al. Impact of lymph node metastasis on the pattern of failure and survival in oral carcinomas. *Am J Surg* 2003;185:278-84.

Shintani S, Zhang T, Aslam A, Sebastian K, Yoshimura T, Hamakawa H. P53-dependent radiosensitizing effects of Hsp90 inhibitor 17-AAG on human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 2006;29:1111-7.

Simpson L, Parsons R. PTEN: Life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001;264:29-41.

Singh B, Reddy PG, Goberdhan A, Walsh C, Dao S, Ngai I, et al. p53 regulates cell survival by inhibiting PIK3CA in squamous cell carcinomas. *Genes Dev* 2002;16:984-93.

Söderlund K, Pérez-Tenório G, Stål O. Activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway prevents radiation-induced apoptosis in breast cancer cells. *Int J Oncol* 2005;26:25-32.

Solit DB, Basso AD, Oishen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of Heat Shock Protein 90 Function Down-Regulates Akt Kinase and Sensitizes Tumors to Taxol. *Cancer Res* 2003;63:2139-44.

Staal SP. Cancer Gastric development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5034-37.

Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, et al. Regulation of PTEN transcription by p53. *Molecular Cell* 2001;8:317-25.

Stommel JM, Wahl G M. Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *EMBO J* 2004;23:1547-56.

Sumitomo M, Iwase A, Zheng R, Navarro D, Kaminetzky, D, Shen R, et al. Synergy

in tumor suppression by direct interaction of Neutral Endopeptidase with PTEN. *Cancer Cell* 2004;5:67-78.

Testa JR, Bellacosa A. The activity of Akt is regulated by its carboxyl-terminal region. *Leukemia Res* 1997;21:1027-31.

Testa JR, Bellacosa A. Akt plays a central role in tumorigenesis. *PNAS* 2001;98(20):10983-5.

Thant AA, Nawa A, Kikkawa F, Ichigotani Y, Zhang Y, Sein TT, et al. MMP in tumorigenesis. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:423-28.

Tokalov SV, Pieck S, Gutzeit HO. Varying responses of human cells with discrepant p53 activity to ionizing radiation and heat shock exposure. *Cell Prolif* 2007;40:24-37.

Trotman LC, Pandolfi PP. PTEN and p53: Who will get the upper hand? *Cancer Cell* 2003;3:97-9.

Vara JAF, Casado E, Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Baron MG. PI3K/Akt signaling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004;30:193-204.

Vargas H, Pitman KT, Johnson JT, Galati LT. More aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the anterior tongue in young women. *Laryngoscope* 2000;110:1623-26.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, Cochrane S, Morrison P, Woll P, et al. A previously undescribed mutation within the tetramerisation domain of TP53 in a family with Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene* 1996;12:2437-42.

Vazquez F, Sellers WR. The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of

phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochem Biophys Acta* 2000;1470:21-35.

Vestey SB, Sem C, Calder CJ, Perks CM, Pignatelli M, Winters ZE. Activated Akt expression in breast cancer: Correlation with p53, Hdm2 and patient outcome. *Eur J Cancer* 2005;41:1017-25.

Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Chikhlikar PR. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: Multivariate analysis. *J Oncol* 2003;82:34-50.

Walerych D, Kudla G, Gutkowska M, Zylicz M. HSP90 chaperones wild-type p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 2004;279(47):48836-45.

Wang YC, Lin RK, Tan YH, Chen JT, Chen CY, Wang YC. Wild-Type p53 Overexpression and Its Correlation With Mdm2 and p14ARF Alterations: An Alternative Pathway to Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(1):154-64.

Wee KB, Aguda BD. Akt versus p53 in a network of oncogenes and tumor suppressor genes regulating cell survival and death. *Biophys J* 2006;91:857-65.

West K A, Castilo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathways and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* 2002;5:234-48.

Willians H K. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2000;53:165-72.

Yan X, Fraser M, Qiu Q, Tsang BK. Over-expression of PTEN sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner. *Oncology* 2006;5:1-8.

Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Mizuno A. p53, mdm2 and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Maxillofac Pathol* 2002;94(5):593-600.

Yin X, Zhang H, Burrows F, Zhang L, Shores CG. Potent activity of a novel dimeric heat shock protein 90 inhibitor against head and neck squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*. Clin Cancer Res 2005;11(10):3889-96.

Zhou PB, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee M, Hung M. Cytoplasmic localization of p21^{Cip1/WAF1} by Akt-induced phosphorylation in HER-2/Neu-overexpressing cells. Nature Cell Biol 2001;3:245-52.