ROBERTO ANAXIMANDRO GARCIA REJAS

**Expressão das proteínas c-jun,junb, JNK e pc-jun no carcinoma
adenóide cístico e carcinoma epidermóide da cavidade bucal**

São Paulo

2011

Roberto Anaximandro Garcia Rejas

**Expressão das proteínas c-jun,junb, JNK e pc-jun no carcinoma
adenóide cístico e carcinoma epidermóide da cavidade bucal**

Versão original

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

Orientadora: Prof. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa

São Paulo

2011

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

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rejas, Roberto Anaximandro Garcia

Expressão das proteínas c-jun, junb, jnk e pc-jun no carcinoma adenóide cístico e carcinoma epidermóide da cavidade bucal : [versão original] / Roberto Anaximandro Garcia Rejas; orientador Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa. -- São Paulo, 2011.

72p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Proteínas proto-oncogênicas. 3. Proteínas quinases. 4. Adenocarcinoma. I. Sousa, Suzana Cantanhede Orsini Machado de. II. Título.

Rejas RAG. Expressão das proteínas c-jun,junb, JNK e pc-jun no carcinoma adenóide cístico e carcinoma epidermóide da cavidade bucal. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a).:_____Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a).:_____Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a).:_____Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a).:_____Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a).Dr(a).:_____Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Primeramente a Dios que me dió la oportunidad de atravesar diferentes fronteras y adquirir nuevos conocimientos, por su presencia, guía y fortaleza constante en mi vida, nada de esto seria posible sin Él.

A mi esposa Dubeiza por la comprensión y apoyo en la realización de esta meta, a mis hijos Santiago y Joaquim que son el impulso para superarme y seguir adelante .

A mis padres Roberto y Lindaura ejemplos de trabajo, persistencia e integridad que llevare conmigo para siempre.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora Profa. **Suzana Cantanhede Orsini Machado de Souza** primeramente pela oportunidade de fazer o doutorado, pelo apoio, paciência e pelos conhecimentos transmitidos ao longo destes anos.

Ao professor **Decio dos Santos Pinto Junior** pela energia que irradia como pessoa e profissional. O meu reconhecimento e gratidão, por mostrar com outras perspectivas o mundo da patologia e da ciência.

Ao Professor **Fabio D. Nunes** exemplo de profissionalismo, por todos os ensinamentos e conselhos valiosos.

A professora **Marilia Martins** competente profissional, cujos ensinamentos foram fundamentais para minha formação.

Todos vocês contribuíram na minha formação na pós-graduação e são exemplos que seguirei na minha vida académica .

Obrigado.

AGRADECIMENTOS

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, Profa. Dra. **Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães**, Profa. Dra. **Andrea Manteso** pelos ensinamentos concedidos.

A **Marco Squadrans** que sempre esteve disposto a me ajudar em todos os momentos que precisei.

A meus amigos novos e antigos da pós graduação **Elder e Flavia, Cury, Brunno, Alexandre, Yonara, Tuti, Aluana, Fabio Coracin, Marina de Deus, Patrícia Dash, Alexandra, Ângelo, Fernanda Giudice, Felipe Sperandio, Karin, Joelma, Fátima, Camila Rodini, Marcio, Lucyene Miguita, Magâ, Narciso e Valtuir** pela convivência fraternal, troca de conhecimentos e piadas.

À **Adriana e Juvani** por ter me ensinado as técnicas no laboratório de biologia celular e, por sua amizade e estímulo constante.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação pelas experiências e informações compartilhadas, foram muito valiosos durante todo o curso.

À **Elisa Santos e Beatriz (Bia)** minha mãe adotiva no departamento, por me acolher dia a dia durante estes anos fazendo minha estada no laboratório muito mais agradável. Agradeço também, pelo importante auxílio técnico prestado.

Às funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal **Nair, Zilda e Neia** pela atenção prestada durante o curso.

Rejas RAG. Expressão das proteínas c-jun,junb, JNK e p-c-jun no carcinoma adenóide cístico e carcinoma epidermóide da cavidade bucal [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2011. Versão Original

RESUMO

O carcinoma adenóide cístico e o carcinoma epidermóide são neoplasmas de origem epitelial que afetam a cavidade oral. O carcinoma adenóide cístico pode apresentar-se em glândulas salivares maiores e menores, possui alta propensão de invasão perineural e o padrão de infiltração: sólido, tubular e cribriforme. O carcinoma epidermóide foi descrito como um processo multifatorial envolvendo agentes físicos, químicos e virais, capazes de afetar o metabolismo celular e induzir a proliferação neoplásica. As proteínas c-jun e junB são membros da família JUN, capazes de homodimerizar ou heterodimerizar com c-fos ou com outras proteínas bzip. Evidências das funções específicas das subunidades do AP-1 foram mostradas por c-jun e junB, que podem atuar antagonicamente ou não no controle da transformação celular, diferenciação e expressão do AP-1 dependente do gene alvo. Mas a função de ambos é complexa e pode depender do tipo celular. A cJun N Terminal quinase (JNK) é um importante regulador positivo e/ou negativo do AP1. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão das proteínas c-jun, pc-jun, junB e JNK em carcinoma adenóide cístico de glândula salivar e no carcinoma epidermóide da cavidade oral, através das técnicas de imunohistoquímica, imunofluorescência e western-blotting, em biopsias de tecido e

linhagens celulares provenientes destas lesões. Os resultados evidenciaram a expressão da proteína cjun no carcinoma adenoide cístico e de cjun e junB no carcinoma epidermóide. Não foi detectada a expressão de JNK nas neoplasias estudadas. A expressão destas proteínas no carcinoma adenóide cístico e no carcinoma epidermoide sugere que estas participam na progressão tumoral e/ou tumorigênese destas neoplasias compartilhando uma via em comum.

Palavras Chave: Carcinoma adenóide cístico, Carcinoma de células escamosas, Proteínas proto-oncogênicas .

Rejas RAG. c-jun, junB, JNK and pc-jun protein expression in adenoid cystic carcinoma and squamous cell carcinoma of the oral cavity. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2011. Versão Original

ABSTRACT

Adenoid cystic carcinoma and squamous cell carcinoma are epithelial neoplasms that occur in the oral cavity. Adenoid cystic carcinoma can appear in minor and major salivary glands and it presents a high propensity to invade perineural areas and can show different patterns of growth: solid, tubular and cribriform. Squamous cell carcinoma was described as a multifactorial process involving chemical, physical and viral agents which are able to affect the cellular metabolism and induce neoplastic proliferation. The proteins cjun and junB are members of the JUN family able to homodimerize or heterodimerize with cfos and other bzip proteins. Evidence of specific functions of AP1 subunits was shown for cjun and junB that can act antagonistically or not on the control of cellular transformation, differentiation and expression of AP1 depending on the target gene. But the way both of them function is complex and may depend on the cellular type. cJun N terminal kinase (JNK) is an important positive or negative regulator of AP1.

The aim of this study is to evaluate the expressions of cjun, pcjun, junB and JNK in the adenoid cystic carcinoma of salivary glands and squamous cell carcinoma from the oral cavity through immunohistochemistry, immunofluorescence and western blot techniques in tissue biopsy and cell lines from both tumors. The results will show the expression of cjun protein in the

adenoid cystic carcinoma and cjun and junB expression in the squamous cell carcinoma. JNK expression was not detected in the studied tumors. The expression of these proteins in adenoid cystic and squamous cell carcinoma suggests that they participate on the tumor progression and tumorigenesis of these neoplasms, that can share a common pathway

Keywords: Adenoid cystic carcinoma, Squamous cell carcinoma, Proto-oncogene

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1- Cascata SAPK / JNK.....	26
Figura 5.1 – Aspectos histopatológicos do carcinoma adenóide cístico em hematoxilina e eosina (A) e (B). Expressão nuclear das proteínas c-jun (C) e (D) e p-cjun (E) e (F) nos subtipos cribriforme e sólido do carcinoma adenoide cístico.....	52
Figura 5.2 - Expressão nuclear das proteínas junB (A) e p-c-jun (B) em carcinoma epidermóide. Hematoxilina eosina (C). Expressão citoplasmática da proteína c-jun em glândula salivar normal (D) e mucosa normal (E).....	53
Figura 5.3 - Imunoexpressão das proteínas c-jun e p-c-jun (A, B) e junB e p-c-jun (C, D) nas linhagens CAC e HSG respectivamente. Imunoexpressão das c-jun e junB (F, G) e c-jun e p-c-jun (H, I) na linhagem SCC25 e QT respectivamente.....	55
Figura 5.4 – Resultados quantitativos em western blotting relativos à expressão das proteínas c-jun, p-c-jun, junB e β -actina nas linhagens CAC2, HSG, SCC25 e QT.....	57
Gráfico 5.1- Médias das expressões nucleares das proteínas c-jun e p-c-jun nos diferentes padrões histológicos dos carcinomas adenóides císticos.....	50
Gráfico 5.2- Médias das expressões nucleares das proteínas c-jun, p-c-jun, junB e JNK nos carcinomas epidermóides estudados.....	51

Gráfico 5.3 – Média dos valores obtidos das bandas de western blotting.

Expressão das proteínas c-jun, p-c-jun e junB nas linhagens
CAC2 e HSG (à esquerda) e SCC25 e QT (à
direita).....57

LISTA DE TABELAS

Quadro 4.1 - Relação dos carcinomas adenóides císticos incluídos no estudo.....	36
Quadro 4.2 - Relação dos incluídos no estudo carcinomas epidermóides.....	37
Tabela 4.1 - Relação dos anticorpos utilizados na imunofluorescência.....	40
Tabela 4.2 - Relação de reagentes utilizados gel 10% acrilamida com SDS..	43
Tabela 4.3 - Relação dos anticorpos utilizados no Western Blotting.....	44
Tabela 4.4 – Imuno-histoquímica: anticorpos, concentração e tempo de incubação.....	47
Tabela 5.1- Análise estatística dos resultados obtidos pelas leituras das bandas (triplicata) nas linhagens em estudo.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Ativador da proteína 1
APB	Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau
BSA	Sigla em inglês para albumina de soro bovino
c-jun	Proteína c-jun
CA	Califórnia
CAC	Carcinoma adenoide cístico
Co	Sigla em inglês “company”
DAB	Diaminobenzidina
Et al	e colaboradores
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
JunB	Proteína junB
PBS	Soro fetal Bovino
p-c-jun	Proteína fosforilada c-jun
Sup.	Superior
Tris	Tris-hidróxi-metil-aminometano
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Valores percentuais
°C	Graus Celsius
μl	Microlitro
ml	Mililitro
pH	Medida do potencial hidrogeniônico
μm	Micrômetro
x	vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3 PROPOSIÇÃO.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Casuística.....	35
4.2 Cultivo celular.....	38
4.3 Imunofluorescência.....	39
4.4 Western-Blotting.....	41
4.5 Imuno-histoquímica.....	45
5 RESULTADOS.....	49
6 DISCUSSÃO.....	59
7 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo estudo das bases moleculares que participam dos processos de diferenciação, proliferação e morte celular, processos esses que envolvem também a carcinogênese e desenvolvimento de várias neoplasias, vêm-se tornando cada vez mais intenso, demonstrado pelo grande volume de pesquisas em todo o mundo. O emprego de marcadores na avaliação do comportamento biológico no carcinoma adenóide cístico e no carcinoma epidermóide da cavidade bucal é notório, mas ainda os resultados são controversos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Na cavidade bucal, as neoplasias epiteliais podem ser originárias do epitélio de revestimento, epitélio glandular ou epitélio odontogênico. Neste estudo avaliaremos dois tipos de neoplasias de origem epitelial de ocorrência em cavidade oral – carcinoma epidermóide e carcinoma adenóide cístico.

O carcinoma epidermóide é uma neoplasia epitelial, invasiva, com variados graus de diferenciação escamosa e uma propensão precoce e extensa a metástases linfonodais, ocorrendo predominantemente em adultos na 5ª e 6ª décadas de vida.

O carcinoma adenóide cístico é uma neoplasia originária do epitélio glandular constituída por células epiteliais e células mioepiteliais com morfologia variável, dispostas em padrões tubular, cribriforme e sólido. Esta neoplasia tem um curso clínico sombrio e geralmente um desfecho fatal.

2.1 Carcinoma adenóide cístico

O carcinoma adenóide cístico foi descrito originalmente por Robin & Laboulbene em 1853 (Whear; Addy, 1993) e até 1856 foi denominado como cilindroma por apresentar uma única aparência histológica (Bilroth et al., 1856). Em 1928 foi denominado carcinoma adenóide cístico, e desde então houve uma aceitação deste termo na literatura mundial.

Dentre todas as neoplasias malignas que afetam as glândulas salivares, o carcinoma adenóide cístico é considerado uma das neoplasias mais comuns, podendo ocorrer em qualquer glândula salivar. Segundo Seaver e Kuehn (1979) as glândulas parótida e submandibular são os locais mais freqüentes acometendo cerca de 55% dos casos; por outro lado, Kolude et al. (2001) e Qureshi et al. (2005) apontam as glândulas menores e a glândula submandibular como as localizações mais freqüentes sendo raramente encontrada na glândula parótida. No Brasil, os estudos indicam que o carcinoma adenoide cístico pode representar o segundo tumor mais frequente nas glandulas salivares menores da cavidade bucal (Oliveira et al., 2009).

Quanto à faixa etária o carcinoma adenóide cístico é mais freqüente em adultos apresentando uma média de idade de 47 a 56 anos observando-se uma discreta predileção pelo sexo feminino (Hashimoto et al., 2002; Raux-Rakotomalala et al., 2003).

Geralmente o tumor apresenta-se como uma massa de crescimento lento e persistente, e os sinais e sintomas irão depender, entre outros fatores de sua localização e extensão anatômica, não havendo características clínicas específicas para determinar o diagnóstico de carcinoma adenóide cístico. O tumor tem uma predileção pela invasão perineural o que parcialmente explica a tendência à recorrência local do tumor, sendo também responsável pelo desconforto e a dor nos pacientes em aproximadamente 50% dos casos (Spiro, Huvos, 1992; ; Wiseman et al., 2002; Ellis; Auclair, 2008).

Existem três subtipos histológicos diferentes para esta neoplasia: cribriforme, tubular e sólido; tornando a classificação difícil porque o tumor pode evidenciar mais de um subtipo histológico; portanto a classificação deverá

ser feita baseada no padrão histológico predominante. O tipo de padrão predominante presente na lesão tem influência no comportamento e prognóstico da neoplasia. Entretanto, as células tumorais que a compõem são de dois tipos: células luminais e células mioepiteliais (Hashimoto et al., 2002; Barnes et al., 2005; Furuse et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

O carcinoma adenóide cístico típico apresenta um padrão cribriforme com ninhos de células epiteliais arranjadas concêntricamente formando numerosos espaços cilíndricos dando um aspecto de “queijo suíço”. Estes espaços são na sua maioria pseudocistos que apresentam no seu interior proteoglicanas e material semelhante à membrana basal. As células que envolvem estes pseudocistos são células mioepiteliais de núcleo basofílico ovóide e citoplasma escasso. Os espaços ductais são preenchidos por material mucinoso eosinofílico e cercado por células cuboidais “duct-like” apresentando citoplasma mais volumoso e eosinofílico. As figuras de mitose são dificilmente encontradas (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

O padrão tubular é formado por estruturas ductiformes ou tubulares, envoltas por um estroma hialino e pode manifestar características mixoides. Os espaços tubulares são revestidos por células do tipo epitelial luminal, que por sua vez são cercadas por uma camada periférica de células mioepiteliais cuja morfologia geralmente apresenta-se com núcleo angulado e citoplasma claro (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

O padrão sólido apresenta células formando lençóis ou ninhos de variados formatos e tamanhos, e ocasionalmente, áreas de necrose podem ser vistas. As células tumorais são pequenas com núcleo hipercromático denso cuja morfologia varia de cuboidal a basaloide, porém o tipo celular

predominante é o mioepitelial basaloide (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

Muito tem sido feito na tentativa de se determinar fatores prognósticos para o carcinoma adenóide cístico. Alguns desses estudos se baseiam em parâmetros clínicos, onde é levada em consideração a localização de ocorrência do tumor, outros se baseiam no padrão morfológico, onde se acredita que o subtipo sólido é mais agressivo e esta relacionado a um pior diagnóstico. Nenhum desses fatores prognósticos descritos, entretanto é inteiramente confiável e muitos questionamentos existem com relação à sua eficácia. Na busca de fatores prognósticos mais seguros, alguns pesquisadores tem investigado a existência de marcadores imunoistoquímicos que possam esclarecer a origem e desenvolvimento desses tumores.

No momento existe pouca evidência sobre um tratamento sistêmico que mude o curso do carcinoma adenóide cístico. Alguns demonstraram uma grande variedade de quimioterapia, porém inconsistentes e geralmente pobres. A sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 35%, sendo que 80% a 90% dos pacientes morrem em decorrência da lesão em 10 a 15 anos (ELLIS; AUCLAIR, 2008).

2.2.1 Expressão das proteínas c-jun, junb, pc-jun e JNK no carcinoma adenóide cístico

O fator de transcrição AP-1 é relatado em muitos tumores epiteliais, como o carcinoma de colo de útero, pele, mama e cabeça e pescoço (Chen et

al., 1996; Prusty;Das 2005), mais ainda pouco se sabe sobre a função do mitógeno-ativado da proteína quinase (MAPK) e do fator de transcrição AP-1 no carcinoma adenóide cístico nas glândulas salivares da cavidade oral.

Handra et al. (2008) foram os primeiros autores a avaliar proteínas da família AP1 em CAC. Estes autores avaliaram a expressão imuno-histoquímica da forma fosforilada (ativada) das proteínas ERK, P38, e JNK em material parafinado de 61 pacientes. Os autores consideraram apenas a marcação nuclear e encontraram, utilizando avaliação semiquantitativa, heterogeneidade de expressão. Foi usado o valor médio de todos os escores para separar os tumores negativos dos positivos para cada MAPK. O número de tumores positivos foi de 34 (57%) para pErk, 48 (79%) para pJNK, e 38 (63%) para pP38. A correlação foi mais forte para P38 fosforilada e C-jun N-terminal quinase. A expressão da p-c-jun N-terminal quinase foi associada com invasão perineural. Os altos níveis de P38 fosforilado podem estar relacionados com sobrevida de forma independente da proliferação de células tumorais. Os autores mostraram que as três principais MAPK estão ativadas em CAC e sugerem que sua ativação é realizada de forma coordenada e conjunta.

2.2 Carcinoma epidermóide da cavidade oral

As estatísticas oficiais evidenciam que o câncer de boca representa 5% de todas as neoplasias malignas no mundo, chegando a 9% no Brasil. Destes, mais de 90% são representados pelo carcinoma epidermóide (INCA, 2010; Cotran et al., 2000),

No Brasil, as informações de referência 2010 e 2011 segundo o INCA apontam 489.270 novos casos de câncer. Os carcinomas da cavidade oral estão representados principalmente pelos carcinomas de lábio e orofaringe que correspondem a aproximadamente 3 % de todos os casos novos, totalizando 14.120 casos novos nesta região.

Em 2010 e 2011, no Brasil são esperados 10.330 novos casos de câncer da cavidade oral para o sexo masculino e 3.790 para sexo feminino, numa proporção de 3:1. (INCA, 2010).

O carcinoma epidermóide é uma entidade originária do epitélio de revestimento, histologicamente caracterizado por apresentar ilhas e cordões de células neoplásicas que invadem o tecido conjuntivo e formam padrões de diferenciação que imitam os epitélios de superfície (Shafer et al., 1985). Pode apresentar características clínicas variáveis dependendo do seu padrão de crescimento e do tempo de duração. As lesões normalmente são esbranquiçadas e ou avermelhadas, com superfície plana ou granulosa, usualmente ulcerada com bordas elevadas e endurecidas. Esta neoplasia pode acometer qualquer região da boca. Os sítios mais acometidos podem variar de uma região para outra. Em levantamentos recentes a língua mostra-se mais comumente afetada seguida pelo assoalho bucal. (Barnes et al., 2005).

Histopatologicamente, o carcinoma epidermóide apresenta aspectos como a presença de ilhas ou cordões de células epiteliais malignas com capacidade de invadir a lâmina própria adjacente, cuja morfologia por vezes se assemelha com as células epiteliais da camada espinhosa. Estas células epiteliais podem apresentar diversas alterações morfológicas como alterações na relação núcleo/citoplasma, multinucleação, pleomorfismo celular e nuclear,

hipercromatismo nuclear, figuras de mitoses atípicas, entre outros. O estroma também pode apresentar alterações que são induzidas pela presença das células neoplásicas, como a neoformação de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório crônico (Shafer et al., 1985; Barnes et al., 2005).

Estudos anteriores descreveram a etiopatogenia do carcinoma epidermóide como sendo um processo multifatorial envolvendo agentes físicos, químicos e virais, capazes de afetar o metabolismo celular e induzir a proliferação neoplásica (Boyd; Reade, 1988; Scully, 1993), embora o papel de alguns fatores ainda não está totalmente elucidado. Alguns trabalhos também observaram que mesmo na ausência de agentes agressivos pode ocorrer a existência da neoplasia, indicando que alterações genéticas estão intimamente envolvidas no aparecimento das neoplasias (Jin et al., 1999). O carcinoma epidermóide bucal é uma doença genética de patogênese multifatorial. Sua causa envolve fatores intrínsecos relacionados a alterações moleculares e celulares e fatores extrínsecos iniciadores ou promotores como o tabaco e o álcool (Barnes et al., 2005).

2.2.1 Expressão das proteínas c-jun, junb, pc-jun e JNK no carcinoma epidermóide da cavidade oral

Sousa et al. (2002) estudaram a proteína c jun, comparando sua expressão imunoistoquímica em 20 casos de carcinoma epidermóide de boca e em 15 de tecido normal de mucosa. Os autores constataram que a c jun está expressa tanto no carcinoma epidermóide como no tecido normal. Porém, a diferença é que nas mucosas, essa proteína é expressa no citoplasma das

células das camadas superiores e, nos carcinomas, a expressão é nuclear. Os autores consideraram essa diferença como um importante indicativo de participação dessa proteína nos casos de carcinoma epidermóide bucal.

Kuo et al. (2006) investigaram o possível papel do c-Jun ativado na patogênese e prognóstico do câncer oral em Taiwan. Foi realizado através da técnica de imunohistoquímica usando um anticorpo anti-phosphospecific c-Jun (pc-Jun) em carcinomas epidermóides orais (CEO), em cortes embebidos em parafina. A marcação positiva para p-c-jun foi observado em 42 dos 70 (60%) casos de SCC orais. Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre a expressão de pc-Jun e idade dos pacientes, sexo, hábito oral, localização, estadiamento clínico, tamanho do tumor e estado linfonodal. Estatisticamente (Curva de Kaplan-Meier) mostraram que pacientes com CEO com marcação positiva e/ou com marcação positiva em metástases linfonodais tiveram uma sobrevida significativamente menor ($p < 0,018$ e $0,001$, respectivamente, pelo teste log-rank). Os autores concluíram que estes resultados indicam que c-Jun ativado pode desempenhar um papel importante na carcinogênese do carcinoma epidermóide oral. A marcação positiva da pc-Jun poderia servir como um marcador coadjuvante de pior prognóstico em pacientes com carcinomas epidermóides orais.

No estudo de Acay et al. (2008) o objetivo foi correlacionar a detecção HPV DNA com a expressão da proteína c-Jun, um dos princípios componentes do fator de transcrição AP-1, em lesões orais pré-malignas com diferentes graus de displasia epitelial e em carcinomas de células escamosas da cavidade oral. Estatisticamente não foi observada relação significativa entre a expressão de c-Jun e a infecção pelo HPV. Interessantemente o estudo mostrou que a

expressão nuclear da proteína c-Jun aumentou de acordo com o grau de displasia no interior da lesão, exibindo maior expressão no CEO. Resultados iguais foram achados em estudo prévio publicado por Turatti et al. (2005). Os autores indicam que os resultados sugerem que a progressão ou transformação maligna mediada por c-Jun é independente da presença do HPV na carcinogênese oral.

Em 2010 Mishra et al. fizeram um estudo abrangente sobre o papel da família de proteínas JUN e FOS membros do complexo de ativação-1 (AP-1). Neste trabalho estudaram a ativação e padrão de expressão da família de proteínas AP-1 e mRNA em diferentes estágios da carcinogênese oral. Um total de 100 biópsias orais de tecidos frescos foram coletados, compreendendo 50 tumores malignos, 40 pré-malignas e 10 normais (controle). Gel-shift assay, western blotting imuno-histoquímica, e northern blotting foram utilizados. Os resultados evidenciaram uma forte atividade de ligação ao DNA nos carcinomas epidermóides constituído pelos heterodímeros c-Fos/JunD, enquanto que o envolvimento da proteína JunB foi observado apenas em alguns dos tumores malignos. Todas as biópsias de lesões pré-malignas mostraram apenas homodimerização de maneira preferencial para a JunD / JunD. Foi observado também ausência de expressão da proteína c-Jun. Em conclusão, este estudo demonstrou um papel importante do complexo AP-1 durante a progressão da carcinogênese oral.

2.3 C-JUN, JUNB, pC-JUN e JNK

Desde a sua descoberta em 1987, o fator de transcrição AP-1 tem sido estudado extensivamente, a fim de elucidar o papel de cada um de seus componentes na proliferação celular e transformação. No entanto, rapidamente se tornou claro que a atividade de AP-1 se estende muito além dos seus efeitos limitados sobre a proliferação. Uma série de evidências aponta AP-1 na inflamação, diferenciação, apoptose, migração celular e cicatrização de feridas. (Shaulian; Karin 2002; Hess et al., 2004) (Figura 2.1).

As proteínas c-jun e junB são membros da família JUN e fazem parte juntamente com a família de proteínas FOS, MaF e ATF do fator de transcrição AP-1 (Ativador da proteína 1) que regula variados processos, como proliferação celular, morte, sobrevivência e diferenciação.

A família JUN é composta também pela proteína jun D onde o c jun é o mais potente ativador transcricional deste grupo e cuja atividade transcricional é atenuada e/ou antagonizada por junB ou junD (Passequé; Wagner 2000; Pfarr et al., 1994) As diferentes proteínas da família JUN e da família de proteínas FOS são capazes de formar homo ou heterodímeros estáveis que se ligam ao DNA no sítio regulatório denominado sítio de união (ligação) do AP-1 que regula a transcrição dos genes alvos, positivamente ou negativamente, dependendo da composição dos dímeros (Sassone-corsi et al., 1988; Shutte et al., 1989; Ryseck; Bravo, 1991). As amplas possibilidades combinatórias fornecidas pelo grande número de proteínas de AP-1 determinam a sua especificidade de ligação, afinidade e, conseqüentemente, o espectro dos

genes regulados (HESS et al., 2004). A família de proteínas JUN pode tanto homo e heterodimerizar, enquanto que as proteínas Fos não podem homodimerizar, mas heterodimerizando com as proteínas da família JUN, estas conseguem ligar-se ao DNA.

Figura 2.1- Cascata SAPK / JNK (www.cellsignal.com)

A contribuição da AP-1 para a determinação do destino celular é muito importante por que esta depende criticamente da abundância relativa de

subunidades AP-1, da composição de dímeros AP-1, da qualidade do estímulo, do tipo de célula e do ambiente celular.

Com o aumento das evidências que o fator de transcrição AP-1 participa ativamente nos processos de proliferação celular, os pesquisadores começaram a avaliar qual seria o papel desse fator de transcrição e seus variados componentes na promoção tumoral, considerando que a família AP-1 é um dos alvos nucleares para uma série de vias de tradução de sinal, sendo de particular interesse a ação da via RAS-MAPquinase (Hill; Triesman et al., 1995), principalmente porque essa via apresenta-se freqüentemente desregulada pela ativação de vários oncogenes.

Estudos iniciais mostraram que os sítios de acoplamento e substratos específicos do JNK 1 e JNK 2 são diferentes e que a proteína c-jun esta preferencialmente ligada e fosforilada por JNK 1 e ATF 2 fosforilado e ligada a JNK 2 (Kallunki et al., 1996).

A atividade da proteína c-jun é induzida por estímulos extracelulares (fatores de crescimento, estresse celular, citocinas e estímulos constantes de UV) e fosforilado por JNK (JUNquinase) nos sítios específicos Ser-63 e Tyr-73. Outras proteínas da família AP-1, incluindo jun B, jun D e ATF 2 também podem ser ativadas por JNK (Pulverer et al., 1991). Por outro lado estudos mostraram que todas as formas de cascata da proteína quinase mitógeno ativada (MAPK) foram encontrados fazendo parte da regulação da AP-1 (Shaulian; Karin 2002), porém a capacidade de fosforilar JunB é ainda controversa, como mostra um estudo inicial que sugere que não é fosforilada por JNK (Kallunki et al., 1996).

Gee et al. (2000) realizaram um trabalho avaliando com reações imuno-histoquímicas a expressão do c-jun em carcinomas epidermóides de mama e associação com suas características clínicas e biológicas. Foi observado que o c-jun apresentou uma associação positiva com os elementos de sinalização da MAPquinase, fator de crescimento alfa, fator de crescimento epidérmico e com a JUNquinase (JNK), enquanto que a associação com c-fos foi pequena, talvez indicando que pudesse haver outros componentes do fator AP-1 presentes. Também não foi observada associação entre o aumento do c-jun com proliferação e a gradação histológica dos pacientes. Com base nestes resultados os autores sugeriram que a alteração dos componentes do fator de transcrição AP-1 pode influenciar os aspectos fenotípicos dos carcinomas de mama.

Langosh et al. (2000) estudaram a expressão de várias proteínas envolvidas no ciclo celular, correlacionando-as com os membros da família AP-1 (c-fos, fos-B, fra-1, fra-2, c-jun, jun B, jun D) em 53 casos de carcinoma de mama e quatro linhagens celulares, através de análise pela técnica Western-Blot. Foi observado que ocorreram várias relações entre ambos os grupos: enquanto c-jun foi associado com a expressão da pRb, a alta expressão de jun D e c-fos estavam associadas também com a alta expressão da ciclina E. A super expressão do fos-B foi detectada principalmente nos casos com grande marcação para pRb e fraca positividade para o p16. A expressão do fra-1 foi também associada com a super expressão das ciclinas D1 e E, enquanto que a expressão do fra -2 correlaciona-se tanto com a ciclina D1 como com a ciclina E. Com estes resultados os autores sugeriram que pode haver uma ativação direta ou indireta das proteínas no ciclo celular com os

complexos protéicos da família do fator de transcrição AP-1, que fatores estimuladores ou inibidores do ciclo celular podem depender da abundância de tipos específicos de proteínas pertencentes à família do fator de transcrição AP-1.

Meyers et al. (2000) realizaram um estudo para determinar o efeito do bloqueio do fator de transcrição AP-1 no crescimento de células normais, imortais e malignas da região de mama, utilizando um mutante com o domínio c jun negativo. Foi observado primeiramente que a utilização deste mutante inibiu a atividade do fator AP-1 nas células normais e também nas malignas, e que a formação de colônias também foi inibida nas células imortais. Com base nestes resultados os autores demonstraram que as células normais, imortais e algumas linhagens de células malignas necessitam do fator AP-1 para a tradução dos sinais proliferativos nas células, sugerindo que o fator de transcrição AP-1 pode ser um alvo para o desenvolvimento de futuros agentes para a prevenção ou tratamento dos cânceres de mama.

Estudos em células cultivadas tem demonstrado que a via da c-jun N-terminal quinase (JNK) participa na proliferação, diferenciação e apoptose de osteoblastos. Papachristou et al. em 2003 abordaram a possibilidade de uma regulação funcional da via JNK na patogênese dos osteosarcomas. Para isso, a técnica de imunoistoquímica foi empregada para analisar tecido ósseo normal e osteossarcomas em cortes embebidos em parafina de 56 pacientes com tumores de alto grau e 15 pacientes com tumores de baixo grau. Foram avaliados os níveis protéicos das duas principais isoformas JNK (JNK1 e JNK2); seu componente ativado, p-JNK; seu substrato, c-jun; a forma fosforilada p-c-jun e c-Fos. Analisaram também o perfil imunohistoquímico do

complexo (alfa-NAC), que é um osteoblasto-específico coativador da AP-1 que potencializa a atividade transcricional do homodímero c-Jun/c-Jun. A imunomarcação foi positiva para JNK1, JNK2, p-JNK, c-jun, pc-jun, c-Fos, e alfa-NAC foi observada em 86, 93, 94, 99, 97, 99, e 97,5% das amostras, respectivamente, enquanto o osso normal foi desprovida destas marcações. Os níveis celulares de todas as proteínas foram significativamente correlacionados entre si ($P < 0,001$ para cada correlação). Além disso, os níveis de expressão de todas as proteínas foram significativamente mais elevados em tumores de alto grau em relação aos tumores de baixo grau. Quando os níveis celulares dos componentes da via JNK e c-Fos foram avaliados como possíveis marcadores biológicos de grau tumoral, a alta expressão do c-jun e abundante pc-jun previram um alto grau tumoral. Estes estudos fornecem evidências de que a via JNK é funcionalmente ativa na transformação maligna de osteoblastos e do posterior desenvolvimento e progressão de osteossarcomas humanos.

Vleugel et al. (2006) analisaram 103 casos de câncer de mama invasivo com o anticorpo c-jun fosforilado em serina 73. C-jun ativado foi observado predominantemente expresso no núcleo, na frente de invasão em 38% dos casos e 50% dos casos houve marcação para as células mitóticas. Ocasionalmente fibroblastos, células endoteliais e células de mama benignas, mostraram também marcação nuclear. Desta maneira os autores concluíram que os resultados mostraram que ativado, o c-jun é predominantemente expresso na frente de invasão em câncer de mama e que está relacionado com proliferação e angiogênese.

Vasilevskaya e O'Dwyer (2003) acreditam que as vias de sinalização da c-jun e JNK são importantes determinantes para o crescimento tumoral, como para as respostas a terapias, e também em potencial estudo de valor prognóstico de marcadores apoptóticos. Os autores estudaram os efeitos transcricionais de JNK e as interações com outras proteínas na mediação de morte celular de algumas drogas. Em certos tipos celulares, segundo os autores, a superexpressão da c-jun era claramente a base da resistência do DNA aos danos provocados pelas drogas. Finalmente os autores concluíram que mais estudos são necessários para avaliar o potencial da via JNK como o alvo.

Gurzov et al. (2008) investigaram o potencial terapêutico do inibidor SP600125 e do shRNA (short hairpin RNA) reduzindo a expressão da junB em células transformadas usando RNA interference (RNAi). A redução da junB (junB-knockdown) levou a um incremento do número de células e da tumorigênese em fibroblastos selvagens; por outro lado quando a c-jun se encontrava inativa (c-jun-knockout) nas células, os autores observaram apoptose e diminuição da proliferação. Esses resultados indicaram que na ausência de c-jun, junB pode atuar como promotor tumoral. Os autores concluíram que a inativação de ambas as proteínas, c-jun e junB, e uma combinação destes dois tratamentos pode proporcionar uma estratégia valiosa para a terapia antitumoral.

O arsênio é um conhecido carcinogênico humano que está associado com a carcinogênese de pele. Zhang et al. (2009) citam referências de trabalhos anteriores, nas quais a exposição ao arsênio é capaz de induzir a transformação em células epidérmicas JB6 Cl41(ratos), através da ativação da via ERK, ao invés da via JNK. Contudo, novos estudos destes pesquisadores

revelaram que o tratamento desta linhagem celular com baixas doses de exposição de arsênio induzia a transformação celular por meio da ativação da via c-Jun/AP-1; mas por outro lado a expressão ectópica de uma forma mutante da c-jun (TAM67) bloqueava a transformação celular induzida pelo arsênio. Além disso, estes resultados foram relacionados à expressão da ciclina D1, devido à inibição da expressão da ciclina D1 por siRNA específicos em células JB6 Cl41 resultou na redução de crescimento celular (anchorage-independent) induzidas pela baixa dose de arsênio, sendo assim uma importante molécula envolvida (downstream) na via c-Jun/AP-1. Os autores concluíram que os achados demonstraram que a expressão da ciclina D1 mediado por c-Jun/AP-1 é um dos eventos chave implicados na transformação celular ocorrida após a exposição de arsênio.

Estudos atuais demonstram pela primeira vez que a proteína c-Jun (endógena) aumenta o crescimento de linhagem celular, invasão, e expansão de células-tronco tumorais. Foram estudados camundongos transgênicos expressando o oncogene ErbB2 em glândula mamária - alvo e foram cruzados com ratos c-jun^{f/f} transgênicos para determinar o papel da c-jun endógena na invasão tumoral e função das células-tronco. A excisão de c-jun por Cre recombinase reduziu a migração celular, invasão, e formação mammosphere de ErbB2 induzida nos tumores mamários. Em análise proteômica foi identificado um subconjunto de proteínas secretadas (Fator de célula-tronco (SCF) e CCL5) induzida por ErbB2, cuja expressão foi considerada como dependente da expressão c-jun endógena. SCF e CCL5 foram transcricionalmente induzidas pela proteína c-jun. Coletivamente, esses estudos são consistentes com um novo modelo em que a proteína c-Jun pode

aumentar o crescimento do tumor mamário por meio da expansão de células-tronco tumorais (JIAO et al., 2010).

A partir de observações iniciais um modelo surgiu indicando que c-Jun é um regulador positivo da proliferação cuja atividade é positivamente regulamentada pelo JNK, enquanto JunB e JunD antagonizam c-Jun inibindo a proliferação celular e transformação (Szabowski et al., 2000; Winter et al., 2002; Eferl ;Wagner 2003). Este dogma tem sido reexaminado ao longo dos últimos anos. Acredita-se que como a c-Jun, a proteína JunB parece desempenhar também um papel oncogênico, pelo menos teoricamente, de acordo com o modelo sugerido que homodímeros de JunB:JunB podem regular a proliferação positivamente enquanto que heterodímeros c-Jun:JunB, são reguladores negativos (Passequé et al., 2002), então deve-se esperar a perda de expressão da proteína c-Jun para que exista uma sobre-expressão da proteína JunB nas células tumorais; o que indica que junB também pode funcionar como uma oncoproteína.

A decisão quanto ao fator de AP-1 ter papel oncogênico ou anti-oncogênico pode depender da atividade antagônica das diferentes proteínas JUN, FOS, MAF, ect. Mas, provavelmente é também influenciada pelo tipo de tumor, estágio do tumor e dos antecedentes genéticos dos tumores.

Utilizando métodos mais sofisticados, juntamente com estudos em células humanas, estamos certos de aprender mais sobre as funções das proteínas Jun/AP-1 em diferentes tipos de células e órgãos, sobre sua regulamentação e os genes alvo que elas controlam. Explorar esse conhecimento certamente trará benefícios a modernas abordagens terapêuticas na saúde e na doença.

3. PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo é avaliar a expressão das proteínas c-jun, junB, pC-jun e JNK no carcinoma adenóide cístico (CAC) e no carcinoma epidermóide da cavidade oral (CEC), através das técnicas de imunohistoquímica, imunofluorescência e western-blotting, em tecido de biópsias e em linhagens celulares provenientes das lesões.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer 58/11 (Anexo A).

4.1 Casuística

As amostras do presente estudo são compostas por linhagens celulares e cortes de blocos parafinados provenientes de tumores malignos da cavidade oral, glândula salivar normal e epitélio da cavidade oral normal, as quais foram usadas como controle.

Para o estudo, foram selecionados 17 casos de carcinoma adenóide cístico, 20 casos de carcinoma epidermóide da cavidade oral, 7 casos de glândula salivar normal e 7 casos de mucosa normal, provenientes dos arquivos do Laboratório de Patologia Cirúrgica da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da FOU SP. As lâminas referentes aos casos e coradas pela técnica da hematoxilina e eosina foram submetidas novamente a um estudo morfológico em microscopia de luz para confirmação do diagnóstico e classificação em subtipos histológicos nos casos do carcinoma adenóide cístico. A origem, localização, sexo, idade e tipo histológico (quando se aplicar) estão descritos nos quadros 4.1 e 4.2.

Para as reações de western blotting e imunofluorescência foram utilizadas linhagens celulares derivadas de carcinoma adenóide cístico (CAC2) e do carcinoma de epidermóide de língua da cavidade oral (SCC-25). E como controle foram usadas linhagem de glândula salivar normal (HSG) e uma linhagem de queratinócito normal (QT) já estabelecida (Klingbeil et al., 2009; Nascimento et al., 2010).

Caso	Exame	Localizacao	Sexo	Idade	Subtipo Histológico
1		Tuber+Trígono	F	32	Cribriforme
2	38194	Mucosa jugal	F	36	Sólido
3	52002	Palato	M	57	Cribriforme
4	9109	Tuber+Trígono	M	34	Sólido
5	44192	Palato	-	-	Sólido
6	30053	Mucosa labial	F	70	Sólido
7	49977	Palato duro	F	35	Cribriforme
8	46609	Mento	F	45	Cribriforme
9	51033	R. retromolar	M	45	Sólido
10	38700	Mucosa jugal	M	45	Tubular
11	43381	Maxila	M	69	Sólido
12	20435	Assoalho	F	47	Cribriforme
13	58981	Palato	F	65	Cribriforme
14	39961	G. Sublingual	F	53	Cribriforme
15	51093	Lingua	F	75	Cribriforme
16	52579	Maxila	M	26	Tubular
17	17074	Palato	-	-	Sólido
	30053				

Quadro 4.1 – Relação dos carcinomas adenóides císticos incluídos no estudo

Caso	N de Exame	Localização	Sexo	Idade
1	58073	Língua	M	61
2	58071	Língua	F	40
3	57999	Assoalho	M	56
4	47734	Assoalho	F	46
5	57524	Palato	F	73
6	57336	Língua	F	69
7	57171	Assoalho	M	90
8	57097	Palato	M	59
9	56795	Língua	F	70
10	56754	Assoalho	M	51
11	62554	Mucosa	M	73
12	62383	Língua	M	62
13	62579	Língua	M	60
14	62294	Assoalho	M	43
15	62406	Língua	F	62
16	62784	Língua	M	63
17	62490	Trígono R.	F	71
18	62917	Rebordo	F	95
19	62724	Assoalho	M	58
20	62526	Úvula	M	70

Quadro 4.2 – Relação dos carcinomas epidermóides incluídos no estudo

4.2 Cultivo Celular

Todos os procedimentos do cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar para manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura utilizados.

As células estocadas em freezer de nitrogênio líquido em tubos de congelação, crio-protegidas por di-metil-sulfóxido (DMSO – Sigma Chemical, CO., St. Louis, MO, USA), foram descongeladas em banho Maria a 37°C por 2 minutos. As células em suspensão foram transferidas para placas de Petri de 75cm² contendo 15ml de meio de cultivo fresco (DMEM – meio de Eagle modificado por Dulbecco - Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) e mantidas em estufa à temperatura de 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. Após a adesão das células, o meio de cultura foi trocado, (isto ocorrendo sempre dentro de um período de até 24 horas). O crescimento de células foi monitorado em microscópio invertido de fase, e o meio de cultura trocado sempre de acordo com o metabolismo celular, mas não ultrapassando três dias consecutivos. Foi utilizado o método visual para verificar a necessidade de troca de meio de cultivo com a utilização de microscópio invertido de fase (Zeiss- Axiovert-Carl Zeiss, Oberochen, Alemanha).

Após atingirem a sub-confluência (75% do fundo da placa aproximadamente), as células foram subcultivadas de acordo com a necessidade de novas placas. O meio de cultura foi removido, as placas com a monocamada celular lavadas com PBS, sem cálcio e magnésio, pH 7.2 e então separadas com 2ml de solução de tripsina (Sigma) 0,25% com EDTA 1mM

(Sigma) durante aproximadamente 3 a 5 minutos, dependendo o tipo celular, em temperatura de 37°C. O meio de cultura foi utilizado para inativar a enzima, e as células em suspensão foram centrifugadas a 300 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente. Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspensionado em meio de cultura fresco e alíquotas distribuídas em novas placas para novo crescimento celular.

4.3 Imunofluorescência

As linhagens de CAC2, SCC-25, HSG e QT foram submetidas à reação de imunofluorescência com anticorpos contra as proteínas c-jun, p-c-jun, junB e JNK.

Para esta técnica as células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro até o momento da reação e cuidadas da maneira descrita anteriormente. Para uma melhor visualização e clareza da reação, não foi permitida a confluência celular.

No momento da reação, as lamínulas de vidro foram lavadas três vezes com PBS e, em seguida, fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos a temperatura ambiente, e, então, lavadas 5 vezes em PBS.

Após a lavagem, as lamínulas seguiram para a fase de bloqueio, onde foram incubadas em solução de PBS 1X+BSA a 1% de forma que a superfície onde as células foram plaqueadas permanecessem imersas por 30 minutos. Após esse período, foram feitas 4 novas lavagens em PBS.

Os anticorpos primários foram diluídos em PBS + BSA a 1% nas concentrações e tempo de incubação estão descritos na tabela 4.1. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas novamente com PBS.

Tabela 4.1 - Relação dos anticorpos utilizados na imunofluorescência

Soro	Tipo	[]	Procedência	Clones	Incubação
c-jun	Policlonal	1:200	Santa Cruz, CA	H-79	60 minutos
p-c-jun	Monoclonal	1:50	Santa Cruz, CA	KM-1	60 minutos
junB	Monoclonal	1:50	Santa Cruz, CA	C-11	60 minutos
JNK	Monoclonal	1:50	Santa Cruz, CA	F-3	60 minutos

Após a lavagem, seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário conjugado com fluoresceína (Novocastra Laboratories Ltda – UK), na concentração de 1: 150 por 45 minutos, em temperatura ambiente e em câmara escura. As lamínulas foram, então, lavadas 4 vezes em PBS.

Em seguida, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro previamente limpas, utilizando-se solução de VectaShield com DAPI (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA 94010) objetivando a visualização do núcleo das células de forma que mesmo as células negativas pudessem ser evidenciadas.

Como controle negativo, as amostras foram tratadas como descrito acima, porém com omissão do anticorpo primário.

O material foi protegido da luz até o momento da visualização em microscópio invertido de fase. A documentação foi realizada por captura

fotográfica das imagens em câmera acoplada a microscópio (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

As proteínas estudadas foram analisadas em relação à expressão, à localização e ao padrão da marcação.

4.4 Técnica de Western Blotting

Para o estudo da interação das proteínas, foi realizada a extração das proteínas das células previamente cultivadas. Após a sub-confluência (75% da área cultivável), o meio foi removido e as células, lavadas 2 vezes com PBSA a frio e colocadas sobre o gelo (4°C). Foi adicionado 0,5 ml/placa de tampão RIPA+ (10 mol/L Tris HCl pH 7,5; 1% de desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2µg/ml aprotinina, 2µg/ml pepstatina, 1Mm PMSF) com inibidor de protease e as células incubadas por 10 minutos a 4°C e sob agitação. As placas foram raspadas e o lisado centrifugado a 15.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e estocado a -80 °C.

As proteínas dos lisados foram quantificadas através do método do ácido biocinconinico (BCA Protein Assay Reagent Kit – Pierce Chemical CO, Rockford, IL, USA) que tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre resultando na redução do mesmo, formando um complexo de peptídeos com o cátion cuproso. Por sua vez, o ácido biocinconinico reage com o cátion cuproso, formando o complexo BCA-Cu⁺, produzindo uma cor púrpura que é lida no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 562 nm, ou seja,

quanto mais intensa for a cor púrpura, mais absorção de luz ocorrerá, significando maior quantidade de proteína.

As amostras foram, então, analisadas por Western-Blotting, como segue: A mesma quantidade de proteína total foi utilizada para os grupos estudados, o que permite posterior análise da porcentagem em que cada proteína de interesse se apresenta nessas proteínas totais. As alíquotas previamente quantificadas foram fervidas por 5 minutos com tampão de amostra para a denaturação das proteínas (sample buffer), contendo 3% de dodecil sulfato e sódio (SDS), 150 mM tris pH 6,8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. Em seguida, foi aplicado 20 µg de proteína total com 6 µL tampão de amostra por canaleta, as quais foram empilhadas em gel de empilhamento (preparado com 0,15M tris, 30% bis-acrilamida, 10% SDS, 20% persulfato de amônia e TEMED), separadas em gel de poliacrilamida 10% e 12.5% de acordo com o peso molecular da proteína estudada (Tabela 4.2). Em seguida, foi realizada a eletroforese a 120 V e corrente elétrica de 100mA durante 180 minutos. Foi utilizado o padrão de peso molecular Kaleidoscope (BioRad, Hercules, Califórnia, USA).

Tabela 4.2 - Gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm)

	Gel de separação	Gel de empilhamento
	10% (para 10ml)	5% (para 5ml)
Água	4 ml	3,4 ml
Acrilamida/bisacrilamida	3,3 ml	0,85 ml
Separating buffer	2,5 ml	-
Stacking buffer 4X	-	0,625 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,05 ml
Persulfato de ammonia	0,1 ml	0,05 ml
Temed	0,004 ml	0,005 ml

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (Amersham) foi realizada por eletro-transferência úmida em aparelho especial (Hoefer miniVE, Amersham), com utilização do tampão de transferência (48 mM Tris-Base; 39 mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) como recomendado pelo fabricante e utilizada uma tensão de 100 V e corrente elétrica de 70mA por 180 minutos. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio.

Para os anticorpos c-jun, junB e JNK o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado utilizando-se 5% de leite em pó desnatado diluído em TBST por 2 horas à temperatura ambiente e sob agitação. No caso do anticorpo pc-jun, foi utilizado BSA 1% em TBST, devido à interferência que proteínas do leite podem exercer em sítios de ligação para proteínas fosforiladas.

Em seguida, o anti-soro de interesse (c-jun, p-c-jun, junB e JNK) foi diluído em solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST e em BSA 1%

em TBST respectivamente, e a seguir incubado *overnight* em geladeira sob agitação (Tabela 4.3). Após o período de incubação, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos com TBST para remoção do anticorpo não absorvido, sob agitação e em temperatura ambiente. O anticorpo secundário (conjugado com peroxidase) foi, então aplicado por 1 hora e depois a membrana lavada 2 vezes com TBST por cinco minutos cada e 2 vezes com PBS 1x.

Tabela 4.3 - Relação dos anticorpos que utilizados no Western Blotting

Soro	Tipo	[]	Procedência	Clones	Incubação
c-jun	Policlonal	1:200	Santa Cruz, CA	H-79	<i>overnight</i>
p-c-jun	Monoclonal	1:50	Santa Cruz, CA	KM-1	<i>overnight</i>
junB	Monoclonal	1:50	Santa Cruz, CA	C-11	<i>ove-night</i>
JNK	Monoclonal	1:50	Santa Cruz, CA	F-3	<i>overnight</i>

A revelação da reação foi realizada pelo método colorimétrico, através da utilização do kit Opti 4CN (Bio-Rad). Uma parte do diluente concentrado Opti-4CN foi adicionado a nove partes de água deionizada. Foram utilizados 0,25 ml para cada cm² da membrana. Para cada 10 ml do diluente preparado foram adicionados 0,2 ml de substrato Opti-4CN, e colocado sobre a membrana. A membrana foi incubada no substrato por até 45 minutos, depois lavada em água deionizada por 15 minutos, assim estava pronta para documentação fotográfica. Esta reação produziu uma coloração enegrecida nas bandas positivas para o anticorpo primário de interesse.

Como controle da quantidade total de proteínas colocadas em cada canaleta, foi realizada a reação com o anticorpo anti β -actina, pois a mesma representa uma proteína estrutural presente em todas as linhagens celulares.

As imagens foram adquiridas por um escaneador de imagens e as bandas das proteínas das amostras e controles foram comparadas (em função dos pixels e da área da banda) utilizando o programa IMAGE J 1.33u (programa de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband NIMH, NIH, USA). Os resultados foram apresentados em forma de gráfico, mostrando o valor que cada banda ocupa em relação à área selecionada. O experimento foi realizado em triplicata.

Os valores em triplicata obtidos da análise densitométrica das bandas do western blotting foram avaliados através do programa BioEstat 4.0. Os valores em triplicata foram analisados estatisticamente através do método U de Mann-Whitney.

4.5 Técnica de Imuno-histoquímica

A expressão imuno-histoquímica das proteínas estudadas foi obtida através da técnica do polímero marcado com peroxidase. Os cortes fixados em formalina a 10% foram seccionados com a espessura de 3 μ m e estendidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto, secas e mergulhadas por dois minutos em solução de 3-aminopropyltriethoxysilano (Sigma Chemical CO., St Louis, MO/USA) a 10% em álcool absoluto. Foi feita a

desparafinização em dois banhos de xilol: o primeiro a 60 °C por 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente por 20 minutos. Os cortes foram reidratados em série descendentes de etanóis, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguido por etanol 95%, 85% e 80% durante 5 minutos cada. Com a finalidade de se remover o pigmento formólico, os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol 95% durante 10 minutos. Logo depois, foi realizada a lavagem em água destilada e seguindo-se o tratamento de recuperação antigênica.

A recuperação antigênica das proteínas foi realizada com ácido cítrico (10mM, pH 6.0), em banho-maria a 95°C durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, seguidas por 2 banhos em água deionizada.

Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com 2 banhos de 15 minutos em solução de H₂O₂ 20 volumes (6%) e metanol (1:1). Os cortes foram lavados novamente por 10 minutos em água destilada e 2 vezes em água deionizada. Logo após, foi realizado tamponamento com 3 banhos de 5 minutos em solução de Tris pH 7,4.

As concentrações e tempo de incubação dos anticorpos primários que foram utilizados estão ilustrados na Tabela 4.4. As reações imuno-histoquímicas foram realizadas manualmente.

Tabela 4.4 – Imuno-histoquímica: anticorpos, concentração e tempo de incubação

Soro	Tipo	[]	Procedência	Clones	Incubação
c-jun	Policlonal	1:200	Santa Cruz, CA	AP-1	<i>overnight</i>
p-c-jun	Monoclonal	1:200	Santa Cruz, CA	Thr-91	<i>overnight</i>
junB	Monoclonal	1:200	Santa Cruz, CA	C-11	<i>overnight</i>
JNK	Monoclonal	1:200	Santa Cruz, CA	F-3	<i>overnight</i>

Após a incubação dos anticorpos primários, foi feito o tamponamento com 2 banhos em TRIS pH 7,4 e incubação com o kit Envision (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos. Em seguida foi realizada a lavagem em TBST pH 7,6 (2 banhos). Para a reação de revelação foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina 0,025%(DAB 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St Louis, MO/USA) por 10 minutos. Após a lavagem, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer. Posteriormente, todos os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafanizados em 3 banhos de xilol e montados em resina Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA), para exame ao microscópio de luz.

Como controle negativo da reação, foi omitida a incubação do anticorpo primário. Controle positivo e negativo acompanharam as reações.

4.6 Análise quantitativa das marcações imuno-histoquímicas

Todos os casos foram submetidos à análise quantitativa, realizada por apenas um observador. As células foram consideradas positivas ou negativas para o marcador e as variações de intensidade, devido à sua subjetividade, não foram analisadas. As imagens de cada campo foram obtidas através da microscopia de luz com aumento final de 400 vezes, sob um foco fixo com clareza de campo. Cada proteína foi contada separadamente utilizando o software AxioVision. O sistema computadorizado consiste em um computador com placa de aquisição de imagen. As imagens do campo obtidas em um microscópio Zeiss-Imager A1, acoplado a uma câmera Zeiss AxioCam HRc, foram transferidas para o monitor conectado ao computador.

Após a montagem, realizou-se a contagem de 500 células em cada caso, através da escolha de campos aleatórios em regiões mais representativas da lesão. Foi realizada uma escala de marcação na qual foi considerada marcação intensa (>50%), moderada (10 a 50%) e fraca (<10%). Os valores foram analisados estatisticamente através do método de U Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

5.1 Imuno-histoquímica

Quatro marcadores foram testados neste trabalho numa tentativa de estabelecer uma correlação entre eles e o comportamento biológico dos tumores estudados.

Foram consideradas positivas para o c-jun, p-c-jun, junB e JNK, as células que apresentavam reação estritamente nuclear de coloração acastanhada ou amarronzada. Marcação citoplasmática não foi considerada em nosso estudo, embora tenha sido observado expressão citoplasmática das proteínas c-jun e junB.

5.1.1 Expressão imuno-histoquímica para o carcinoma adenóide cístico

A marcação imuno-histoquímica do c-jun e p-c-jun no carcinoma adenóide cístico foi de maneira aleatória no núcleo das células neoplásicas, independente do padrão morfológico, variando de 0% a 80% para c-jun e de 1% a 89 % para o p-c-jun com média de 25,2 % e 35% respectivamente.

Houve diferença na expressão nuclear da proteína p-cjun entre os diferentes tipos histológicos. Os padrões sólido e cribriforme apresentaram média de expressão de 64% e 18,1% respectivamente, valores de expressão

consideradas intensa e moderada, enquanto o padrão tubular apresentou média de 1%, sendo considerada uma marcação fraca. (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1- Médias das expressões nucleares das proteínas c-jun e p-c-jun nos diferentes padrões histológicos dos carcinomas adenóides císticos

No padrão tubular por vezes as células luminais das estruturas ductais eram positivas. As células que revestiam os espaços pseudocísticos, no padrão cribriforme, as estruturas ductais e as células não luminais exibiram positividade, porém era possível observar em varias ocasiões que as células não exibiam positividade nuclear para a proteína c-jun e p-c-jun. O padrão sólido exibiu células c-jun e p-c-jun positivas tanto na periferia como na região central dos ninhos ou lençóis (Figura 5.1).

Submetemos, também, nossa amostra à técnica da imuno-histoquímica com as proteínas junB e JNK, e, em nenhum dos casos estudados a marcação nuclear esteve presente.

Nos casos de glândula salivar normal a marcação foi negativa nas células luminais dos ductos, marcando predominantemente citoplasma. As células acinares e mucosas apresentavam-se sem marcação (Figura 5.2).

5.1.1 Expressão imuno-histoquímica para o carcinoma epidermóide

Dos 20 casos de carcinoma epidermóide analisados, 16 tiveram expressão positiva para a c-jun e p-cjun, e 17 casos para junB foram positivos. As médias das expressões nucleares foram 40.4 para c-jun, 44.7 para p-cjun, 53.9 para junB. Nos casos de mucosa normal a marcação foi negativa em todas as camadas do epitélio. Para a proteína JNK, nenhum dos casos estudados mostrou marcação (Figura 5.2) (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2- Médias das expressões nucleares das proteínas c-jun, p-c-jun, junB e jnk nos carcinomas epidermóides estudados

Os carcinomas investigados apresentaram intensa expressão tanto para as proteínas c-jun, p-cjun com para a proteína junB, mas observou-se em 35% dos casos estudados ausência de expressão da proteína p-cjun e a expressão de junB e vice-versa.

Figura 5.1 - Aspectos histopatológicos do carcinoma adenóide cístico em hematoxilina e eosina (A) e (B). Expressão nuclear das proteínas c-jun (C) e (D) e p-c-jun (E) e (F) no subtipos cribriforme e sólido do carcinoma adenoide cístico

Figura. 5.2 - Expressão nuclear da proteína junB (A) e p-c-jun (B) em carcinoma epidermóide. Hematoxilina eosina (C). Expressão da proteína c-jun em glândula salivar normal (D) e mucosa normal (E) (aumento original = 400x)

5.2 Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência tem como objetivo identificar e localizar as expressões das proteínas-alvo deste estudo.

Foram verificadas marcações nucleares para a proteína p-c-jun nas linhagens CAC2 e SCC25. A marcação de c-jun foi observada nas quatro linhagens CAC2, SCC25, HSG e QT. (Figura 5. 3)

A localização nuclear da proteína junB foi observada apenas na linhagem SCC25 e HSG. (Figura 5. 3)

Todas as linhagens celulares submetidas á aplicação da JNK revelaram ausência de marcação.

Figura 5.3 - Imunoexpressão das proteínas c-jun e p-c-jun (A e B) na linhagem CAC2. Expressão de junB e p-c-jun (C, D) na linhagem HSG. Expressão de c-jun e junB (E e F) na linhagem SCC25 e expressão de c-jun e p-c-jun (G e H) na linhagem QT.

5.2 Western Blotting

A análise da expressão das proteínas utilizadas neste estudo foi realizada pelo ensaio de western blot utilizando lisados celulares previamente quantificados. As amostras de cada linhagem foram padronizadas em uma quantidade de 20µg cada (Figura. 5.4).

Em relação à proteína c-jun, pôde-se observar expressão semelhante nas quatro linhagens CAC2 e HSG, SCC25 e QT. O resultado do teste estatístico mostrou que não há diferenças estatisticamente significantes entre as linhagens analisadas ($p=0.435$) e ($p=0,275$) respectivamente.

A proteína p-c-jun exibiu superexpressão nas linhagens CAC2 e SCC25 em relação à linhagem HSG e QT. Este resultado foi comprovado pelas análises das triplicatas e mostrou significância de ($p=0,0495$) para CAC2-HSG e ($p=0,0495$) para SCC25-QT.

A expressão de junB foi observada em SCC25 e HSG. As médias dos valores das triplicatas são demonstradas no gráfico 5.3

A análise estatística realizada através do teste U de Mann-Whitney entre as linhagens SCC25-QT E CAC2-HSG mostrou significância estatística de ($p=0,0495$) em ambas (Tabela 5.1).

Figura. 5.4 – Resultados quantitativos em western blotting relativos à expressão das proteínas c-jun, p-c-jun, junB e β -actina nas linhagens CAC2, HSG, SCC25 e QT

Gráfico 5.3 – Média dos valores obtidos das bandas de western blotting. Expressão das proteínas c-jun, p-c-jun e junB nas linhagens CAC2 e HSG (à esquerda) e SCC25 e QT (à direita).

Tabela 5.1- Análise estatística dos resultados obtido pelas leituras das bandas (triplicata) nasinhagens em estudo. Valor de p obtido pelo teste de U de Mann-Whitney

	CAC2	HSG	p^a	SCC25	QT	p^a
c-jun	596	595	0,435	264	363	0,275
p-c-jun	418	51	0,0495	153	20	0,0495
junB	0	28	0,0495	293	0	0,0495
JNK	0	0	0	0	0	0

6 DISCUSSÃO

Muitas das bases moleculares que participam dos processos de diferenciação, proliferação e morte celular, são ainda obscuros, assim como os eventos moleculares que envolvem a carcinogênese e o desenvolvimento de várias neoplasias, resultantes de desvios na ativação ou inativação de proteínas.

A atividade da AP-1 é relatada em muitos tumores epiteliais como o tumor de mama, de pele, útero, cabeça e pescoço (Chen et al., 1996; Prusty; Das 2005; Vleugel et al., 2006). Neste estudo avaliamos dois tipos de neoplasias de origem epitelial de ocorrência em cavidade oral – carcinoma epidermóide e carcinoma adenóide cístico, com origens e processos carcinogênicos distintos.

Os resultados obtidos mostraram expressão das proteínas c-jun, p-c-jun, em ambas as neoplasias nas reações imuno-histoquímicas, e confirmada nos testes realizados com cultivo celular. Já a proteína junB, nos cortes teciduais foi expressa apenas no carcinoma epidermóide, tanto no tecido quanto nas células cultivadas.

A expressão no carcinoma adenoide cístico foi assinalada unicamente pela presença das proteínas c-jun e p-c-jun (imuno-histoquímica e western blotting), não expressando as proteínas junB e JNK. Quando analisados os diferentes padrões histológicos do carcinoma adenoide cístico, foram observadas diferenças relevantes na expressão destas proteínas; exibindo uma expressão intensa no padrão sólido, moderada para o padrão cribriforme e

fraca para subtipo tubular; fato diga-se interessante o qual geralmente é associado ao prognóstico do tumor, conforme já observado em outros estudos (Barnes et al., 2005; Lima et al., 2009).

Os resultados da análise imuno-histoquímica do presente estudo para o carcinoma epidermóide não diferem dos resultados da análise da linhagem SCC25 por western blotting, pois mostram expressão tanto para as proteínas c-jun, pc-jun como para a proteína junB em níveis variados. Interessantemente, observou-se em alguns casos (38%) ausência de expressão de uma e a expressão da outra. Evento que se repete em vários estudos, aludindo que a ligação DNA/AP-1 permanece ativa na ausência da transcrição de c-jun, devido ao fato de que junB pode substituir c-jun (Eferl; Wagner 2003; Mishra et al., 2010).

C-jun e junB são membros da família JUN e fazem parte juntamente com a família de proteínas FOS, MaF e ATF do fator de transcrição AP-1 (Ativador da proteína 1) que media a expressão gênica contribuindo para uma diversidade de pontos finais (end points) importantes, como proliferação, diferenciação, transformação e apoptose. Poucos estudos tem examinado a expressão da proteína c-jun em tumores da cavidade oral e nenhum estudo investigou a expressão de junB nestes tumores.

Apesar da c-Jun e junB estarem estruturalmente relacionados e compartilhando muitas propriedades bioquímicas (Nakabeppu et al., 1988), eles diferem significativamente em suas funções biológicas.

Em muitos tipos celulares, c-jun e JunB são geralmente encontrados como genes de proliferação (especialmente c-jun), e sua ativação é necessária para a progressão do ciclo celular e transformação neoplásica (Winter et al.,

2002; Gurzov et al. 2008). Em contraste a estes estudos, a função de junB parece não ser muito clara sendo que outros estudos tem sugerido que pode exercer a sua função inibindo a proliferação celular. (Szabowski et al., 2000; Winter et al., 2002; Zenz et al., 2006).

Neste contexto, devemos também considerar dois importantes reguladores (upstream) positivos e/ou negativos da atividade AP-1, a c-Jun N-terminal quinase (JNK) ou sinal extracelular regulador quinase (ERK) (Liu; Lin 2005; Weston; Davis 2007) devido ao fato de que no presente estudo a expressão da JNK se mostrou ausente em todos os carcinomas adenóides císticos e carcinomas epidermóides.

Os resultados obtidos sugerem que a via da JNK não esta sendo ativada nestes tumores e talvez a expressão das proteínas c-jun e junB esteja sendo induzida por ativação de ERK, como corroboram os estudos feitos por Mishra et al. (2010) em carcinomas epidermóides da cavidade oral, os quais exibiram uma superexpressão para a proteína pERK; e no estudo feito por HANDRA et al. (2008) que demonstraram a expressão significativa da proteína pERK em carcinomas adenóides císticos.

Estudos recentes mostram que há *crosstalk* entre os três principais MAPK (Junttila et al., 2008) no entanto, estas novas observações refletem uma regulação complicada entre JNK e p38 MAPK ou ERK 1/2.

Em suma, nossos resultados sugerem que nas neoplasias malignas da cavidade oral estudadas, há a participação única de c-jun em carcinoma adenóide cístico e a expressão conjunta de c-jun e junB nos carcinomas epidermóides. Ausência de expressão nas neoplasias estudadas indica que a via da JNK esta inativa e parece não acionar as proteínas c-jun e junB. A partir

desse ponto, sugerimos a probabilidade da ativação da via ERK 1/ 2 na ausência da JNK, fundamentados na expressão desta via em estudos realizados em carcinoma epidermóide e carcinoma adenoide cístico (Mishra et al., 2010; Handra-Luca et al., 2008). A via ERK está desregulada em aproximadamente um terço de todos os cânceres humanos e por muitos anos considerou-se simplesmente uma via linear dependente do Ras (Ras/ERK), mas agora é bem conhecido que Ras e ERK podem ser ativadas em vários compartimentos intracelulares sendo possível modular a sinalização de Ras/ERK a partir destes locais (Mckay; Morrison, 2007).

Nestes últimos anos a ativação de Ras por PI3K tem sido estudada e caracterizada em ácido lisofosfatídico (LPA)-induzida por ativação de ERK, demonstrando que a via PI3K não se limita à regulação da cascata AKT/mTORC1 canônico, senão que esta via também afeta Ras/ERK e em vários níveis. No entanto o envolvimento específico PI3K/Ras/ERK pode ser peculiar para cada tumor e pode envolver outras moléculas de sinalização (Carracedo; Pandolfi, 2008).

Vários estudos realizados em carcinomas adenoides císticos e carcinomas epidermóides evidenciam um aumento de atividade em ambas as vias, resultados que sugerem a interação Ras/Raf/MEK/ERK e Ras/PI3K/PTEN/Akt, por conseguinte, a ativação da AP-1, como foi observada neste estudo. (Shen; Sun, 2005; Handra-Luca et al., 2008; Lima et al., 2009; Volker et al., 2009; Mishra et al., 2010; Giudice et al., 2011).

A existência de mecanismos oncogênicos mediados por Ras em diferentes tipos celulares poderá auxiliar o estudo das múltiplas vias envolvidas e aprimorar o desenvolvimento de novas terapêuticas

7 CONCLUSÕES

- Existe superexpressão das proteínas cjun, p-c-jun e junB nos carcinomas epidermóides e superexpressão das proteína c-jun e p-c-jun em carcinomas adenoides císticos quando comparadas à mucosa e glândula normais.
- Não foi detectada expressão de JNK nas neoplasias estudadas.
- Os resultados do presente estudo sugerem que as proteínas c-jun e junB estão envolvidas na progressão tumoral e/ou tumorigênese de carcinoma epidermóide da cavidade bucal.
- A expressão da proteína c-jun no carcinoma adenóide cístico sugere que esta participa também na progressão tumoral e/ou tumorigênese destas neoplasias
- Os resultados sugerem que apesar de serem neoplasias de origens diferentes compartilham uma via comum na carcinogênese.

REFERÊNCIAS ¹

Acay RR, dos Santos E, de Sousa SO. Correlation between c-Jun and human papillomavirus in oral premalignant and malignant lesions. *Oral Oncol.* 2008 Jul;44(7):698-702.

Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005. cap.5, p209-81.

Bilroth T. Beobachtungen über Geschwülste der Speicheldrüsen. *Archives of Pathol and Anat* 1856;17:357.

Boyd NM, Reade PC. Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 1988;12(5):193.

Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*;2007:5527-41.

Chen TK, Smith LM, Gebhardt DK, Birrer MJ, Brown PH. Activation and inhibition of the AP-1 complex in human breast cancer cells. *Mol Carcinog* 1996;15:215-26.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologia estrutural e funcional. 6ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan;2000.

Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003 Nov;3(11):859-68.

Ellis GL, Auclair PL. Tumors of the salivary glands. 4ta. ed. Washington D.C: ART Press; 2008.

¹De acordo com Estilo Vancouver

Furuse C, Sousa SO, Nunes FD, Magalhaes MH, Araújo VC. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. *Int J Surg Pathol*. 2005;13(1):57-65.

Gee JM, Barroso AF, Ellis IO, Robertson JFR, Nicholson RC. Biological and Clinical associations of c-jun activation in human breast cancer. *Int J Cancer*. 2000;89(2):177:86.

Giudice FS, Dal Vechio AM, Abrahão AC, Sperandio FF, Pinto-Junior D dos S. Different expression patterns of pAkt, NF- κ B and cyclin D1 proteins during the invasion process of head and neck squamous cell carcinoma: an in vitro approach. *J Oral Pathol Med*. 2011;40(5):405-11.

Gurzov EN, Bakiri L, Alfaro JM, Wagner EF, Izquierdo M. Targeting c-Jun and JunB proteins as potential anticancer cell therapy. *Oncogene*. 2008;27(5):641-52.

Handra-Luca A, Mauguén A, Ménard P, Fouret P. Coordinated expression of activated mitogen-activated protein kinases in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Hum Pathol*. 2008;39(11):1590-6.

Hashimoto S, Takahashi H, Okamoto M, Yao K, Nakayama M, Makoshi T, Iwabuchi K. Prognostic factors of head and neck adenoid cystic carcinoma: quantitative morphological analysis of 19 cases. *Acta Otolaryngol Suppl*. 2002;(547):93-6.

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 25):5965-73.

Hill CS, Treisman R. Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *EMBO J*. 1995;14(20):5037-47.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010 - Incidência de Câncer no Brasil – 2010 [20/10/2011] Brasília (DF):Ministerio da saúde; 2010. Disponível em: www.inca.com.br)

Jiao X, Katiyar S, Willmarth NE, Liu M, Ma X, Flomenberg N. c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion. *J Biol Chem*. 2010 Mar 12;285(11):8218-26.

Jin YT, Myers J, Tsai ST, Goepfert H, Batsakis JG. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma of young adults. *Oral Oncol* 1999;35:251.

Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*. 2008;22(4):954.

Kallunki T, Deng T, Hibi M, Karin M. c-jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell*.1996;87:929-39.

Klingbeil MF, Herson MR, Cristo EB, dos Santos Pinto D Jr, Yoshito D, Mathor MB. Comparison of two cellular harvesting methods for primary human oral culture of keratinocytes. *Cell Tissue Bank*. 2009;10(3):197-204.

Kolude B, Lawoyin JO, Akang EE. Salivary gland neoplasms: a 21year review of cases seen at University College Hospital, Ibadan. *Afr J Med Sci*. 2001;30:95-98.

Kuo RC, Lin CY, Kuo MY. Prognostic role of c-Jun activation in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 2006; 105(3):229-34.

Langosch KM, Bamberger AM, Methner C, Riek G, Loning T. Expression of cell cycle-regulatory proteins Rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, cyclin D1 and cyclin E in breast cancer : correlations with of activating protein -1 family members. *Int J Cancer*. 2000;(87):468-72.

Lima M de D, Marques YM, Alves S de M Jr, Freitas VM, Soares FA, de Araújo VC, Pinto D dos S Jr, Mantesso A. MDM2, P53 P21, WAF1 and pAKT protein levels in genesis and behavior of adenoid cystic carcinoma. *Cancer Epidemiol.* 2009;33(2):142-6.

Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res.* 2005;(1):36-42.

McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene.* 2007;26:3113-21.

Meyers JHL, Liu Y, Medellin DM, Hilsenbeck SG, Brown PH. AP-1 blockade inhibits the growth of normal and malignant breast cells. *Oncogene.* 2000;(20):2771-2780.

Mishra A, Bharti AC, Saluja D, Das BC. Transactivation and expression patterns of Jun and Fos/AP-1 super-family proteins in human oral cancer. *Int J Cancer.* 2010;126(4):819-29.

Nakabeppu Y, Ryder K, Nathans D. DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. *Cell.* 1988;55(5):907-15.

Nascimento CF, Gama-De-Souza LN, Freitas VM, Jaeger RG. Role of MMP9 on invadopodia formation in cells from adenoid cystic carcinoma. Study by laser scanning confocal microscopy. *Microsc Res Tech.* 2010; 73(2):99-108.

Oliveira FA, Duarte ECB, Taveira AT, Maximo AA, Aquino EC, Alencar RC, Vencio EF. Salivary Gland Tumor: A Review of 599 Cases in a Brazilian Population. *Head and Neck Pathol.* 2009;3:271-5.

Papachristou DJ, Batistatou A, Sykiotis GP, Varakis I, Papavassiliou AG. Activation of the JNK-AP-1 signal transduction pathway is associated with pathogenesis and progression of human osteosarcomas. *Bone.* 2003(4):364-7.

Passegué E, Jochum W, Behrens A, Ricci R, Wagner EF. JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat Genet.* 2002;30(2):158-66.

Passegué E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J.* 2000;15;19(12):2969-79.

Pfarr CM, Mechta F, Spyrou G, Lallemand D, Carillo S, Yaniv M. Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell.* 1994 25;76(4):747-60.

Prusty BK, Das BC. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer.* 2005;113(6):951-60.

Pulverer BJ, Kiriakis JM, Auruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAPKinases. *Nature.* 1991;353:670-4.

Qureshi SS, Nadkarni MS, Shrikhande SV, Desai S, Deodhar K, Ramadwar M. Hepatic resection for metastasis from adenoid cystic carcinoma of parotid gland. *Indian J Gastroenterol.* 2005;24:29-30.

Raux-Rakotomalala F, Houliat T, Martel J, Stoll D, Bedear JP, Darrouzet V. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review of 30 cases. *Rev Laryngol Otol Rhinol.* 2003;124:235-41.

Ryseck RP, Bravo R. c-jun, JunB, and JunD differ in their binding affinities to the Ap-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. *Oncogenes.* 1991;6:533-42.

Sassone-corsi P, Ransone LJ, Lamph WW, Verma IM. Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature.* 1988;336(6200):692-5.

Seaver PR Jr, Kuehn PG. Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. A study of ninety-three cases. *Am J Surg.* 1979;137(4):449-55.

Shafer WG, Hine MK, Levy BM. Tratado de patologia bucal. 4ta ed. Interamerica: Rio de Janeiro;1985: chapter 2. p80-212.

Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 2002;4(5):E131-6.

Schutte J, Viallet J, Nau M, Segal S, Fedorko J, Minna J. Jun B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell.* 1989; 59(6):987-97.

Sousa SOM, Mesquita RA, Pinto DS Jr, Gutkind S. Immunolocalization of c-Fos and c-Jun in human oral mucosa and in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(2):78-81.]

Scully C. Oncogenes, tumor suppressors and viruses in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 1993;22(8):337-47.

Spiro RH, Huvos AG. Stage means more than grade in adenoid cystic carcinoma. *Am J Surg.* 1992;164(6):623-8.

Shen L, Sun CF. The expression of PTEN and PKB in salivary adenoid cystic carcinoma and its clinical significance. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2005; 14(2):159-63.

Stepniak E, Ricci R, Eferl R, Sumara G, Sumara I, Rath M, Hui L and Wagner EF. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes Dev.* 2006;15;20(16):2306-14.

Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Fusenig NE, Angel P. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell*. 2000 22;103 (5):745-55.

Turatti E, da Costa Neves A, de Magalhães MH, de Sousa SO. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Sci*. 2005 Jun;47(2):71-6.

Vasilevskaya I, O'Dwyer PJ. Role of Jun and Jun kinase in resistance of cancer cells to therapy. *Drug Resist Updat*. 2003;6(3):147-56.

Volm M, Drings P, Wodrich W, Van Kaick G. Prognostic significance of the expression of c-fos, c-jun and c-erbB-1 oncogene products in human squamous cell lung carcinomas. *J Cancer Res Oncol* 1993;119 (9):507-10.

Völker HU, Scheich M, Berndt A, Haubitz I, Metzger A, Müller-Hermelink HK, Kämmerer U, Schmidt M. Expression of p-AKT characterizes adenoid cystic carcinomas of head and neck with a higher risk for tumor relapses. *Diagn Pathol*. 2009;19(4):18.

Vleugel M, Greijer A, Bos B, Van der Wall E, van Diest P. c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. *Human Pathol*. 2006;37(6):668-74

Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):142-9.

Whear NM, Addy JM. Adenoid cystic carcinoma of the sublingual gland an unusual presentation. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1993;31(2):113-6.

Winter C, Weiss C, Martin-Villalba A, Zimmermann M, Schenkel J. JunB and Bcl-2 overexpression results in protection against cell death of nigral neurons following axotomy. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002;104(2):194-02.

Wiseman SM, Popat SR, Rigual NR, Hicks WL Jr, Orner JB, Wein RO. Adenoid cystic carcinoma of the paranasal sinuses or nasal cavity: a 40-year review of 35 cases. *Nose Throat J.* 2002;81(8):510-7.

Zenz R, Wagner EF. Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(7):1043-9.

Zhang D, Li J, Gao J, Huang C. c-Jun/AP-1 pathway-mediated cyclin D1 expression participates in low dose arsenite-induced transformation in mouse epidermal JB6 Cl41 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 15;235:18-24.

ANEXO A – Parecer do comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 58/11
CAAE 0043.0.017.000-11

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa “**Expressão das proteínas C-jun, junb, jnk e pC-jun no carcinoma adenóide cístico e carcinoma epidermóide da cavidade bucal**”, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Roberto Anaximandro Garcia Rejas sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em “cd”. Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 25 de maio de 2011.

Profa. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP