BRUNNO SANTOS DE FREITAS SILVA

**Avaliação da expressão das proteínas Twist, Caderina-E, e p-Akt nos eventos
que regem a progressão do carcinoma epidermóide oral**

São Paulo

2011

BRUNNO SANTOS DE FREITAS SILVA

**Avaliação da expressão das proteínas Twist, Caderina-E, e p-Akt nos eventos
que regem a progressão do carcinoma epidermóide oral**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo para obtenção
do 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

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

Silva, Brunno Santos de Freitas

Avaliação da expressão das proteínas Twist, Caderina-E, e p-Akt nos eventos que regem a progressão do carcinoma epidermóide oral [versão original] / Brunno Santos de Freitas Silva; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. -- São Paulo, 2011.

77p. : fig., graf.; 30 cm.

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

1. Neoplasias bucais -- Progressão -- Análise. 2. Patologia Bucal. I. Pinto Júnior, Décio dos Santos Pinto. II. Título.

Silva BSF. Análise da expressão de Twist, E-caderina e p-Akt nos eventos que regem a progressão do carcinoma epidermóide oral. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Luiz** e **Dayse**.*

Dois exemplos de caráter e determinação! Obrigado por terem tecido em mim a perseverança necessária para alcançar meus objetivos.

*Este trabalho é dedicado também a minha noiva, **Fernanda**. Nenhuma tormenta me fez esmorecer, pois eu tinha você! Meu porto seguro!*

Vó, tenho certeza que está vendo isso, eu consegui!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Décio, seu exemplo de profissionalismo e amor pela patologia bucal me impulsionaram durante esses anos, tornando a minha jornada ainda mais estimulante. Com certeza, você é uma das pessoas mais brilhantes que eu já conheci! Agradeço muito a confiança depositada em mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, pela amizade e os ensinamentos transmitidos. Sempre presente, professor e pesquisador exemplar.

Prof^a. Dra. Suzana C.O.M. de Sousa e Prof^a. Dra. Marina H.C.G. de Magalhães, obrigado por terem participado ativamente da minha formação. Seus exemplos me serviram de estímulo para concretização deste objetivo.

Prof^a. Dra. Marília Trierveiler Martins, agradeço muito os conselhos e os conhecimentos transmitidos. Sua dedicação pela docência contagia!

Às Professoras Doutoras Andrea Mantesso e Karem Lopez Ortega, agradeço os ensinamentos e o bom convívio durante esses anos.

Hélder e Flávia, desde a especialização nos identificamos, nos tornamos amigos, culminando com a minha ida à Belém. Obrigado por terem me acolhido, por terem me chamado de amigo, por terem me aceitado dentro do lar de vocês! Levarei nossa amizade no coração pelo resto dos meus dias neste mundo.

Ao amigo Sérgio Cury, obrigado por acreditar em mim, e por fazer da nossa amizade um dos bens mais preciosos que uma pessoa pode ter.

Aos meus sogros, Teruaki e Aparecida, pelo apoio constante e por terem me acolhido na família de vocês.

Fátima, agradeço muito o apoio e as opiniões! Saiba que estes foram de extrema importância para conclusão deste trabalho.

Erika Pereira, Valtuir, Roberto, Yonara, Ronald e Alexandra, cada um de vocês participou de um estágio especial dessa minha jornada. Obrigado!

Karla Rezende, muito obrigada pela ajuda e pela consideração, por mim, e pela Fê.

Aos alunos de mestrado da UFPA Arnaldo, Alessandra e Helena, a torcida de vocês foi muito importante para mim.

Alexandre, Glauber, Lauane, Michelle e Douglas, residentes do Hospital Universitário João de Barros Barreto da UFPA, agradeço a ajuda constante nos contra-tempos diários e na resolução das minhas dúvidas na área de informática.

Aos meus colegas de pós-graduação, aos quais convivi durante esse tempo, e que com certeza, fizeram o ambiente de trabalho mais alegre: Aline, Aluana, Ana Claudia, Ana Rita, Arthur, Camila Rodini, Camila Fragata, Carla, Catalina, Fabio Prosdócimi, Fabio Coracin, Fabiana, Felipe Sperandio, Felipe Daltoé,

Fernanda Giudice, Gabriela, Gustavo, Joelma, Juliana, Karin, Kaue, Kivia, Luana, Luciana, Lucyene, Márcio, Marco Aurélio, Marco Túllio, Fátima, Marina, Michella, Nelise, Patrícia, Paulo Braz, Renata, Thaís, Flávia Caló, Tessa e Paulo Sérgio.

Aos funcionários da FOUSP que me fizeram me sentir em casa, mesmo distante da minha família: Elisa, Bia, Zilda, Neia, Nair, Juvani e Adriana.

“Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho”.

Thomas Jefferson

RESUMO

Silva BSF. Análise da expressão de Twist, caderina-E e p-Akt nos eventos que regem a progressão do carcinoma epidermóide oral [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2011.

A carcinogênese oral é um processo multifásico, onde componentes genéticos levam a desregulação de vias de sinalização celular que controlam funções celulares básicas, como divisão, diferenciação e morte celular. Uma das maneiras de compreender a natureza biológica dos cânceres, além do curso clínico, é através do entendimento do processo de progressão e metástase destas neoplasias. Este estudo teve como objetivo avaliar a participação da proteína Twist no desenvolvimento e progressão dos carcinomas epidermóides orais. Com tal proposta, também foi avaliada a participação das proteínas caderina-E e p-Akt, e sua possível interação com Twist no processo de carcinogênese oral. O trabalho em questão analisou a expressão imuno-histoquímica destas proteínas em 30 espécimes de displasia oral, 20 de carcinoma epidermóide oral e 10 de mucosa oral normal, e avaliou também a possível inter-relação dessas proteínas em linhagens derivadas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço por meio dos ensaios de Western Blotting e imunofluorescência. Os resultados deste estudo demonstraram uma relação inversamente proporcional entre Twist e caderina-E desde os estágios mais precoces da carcinogênese oral. Tal afirmação baseou-se na presença de diferenças significantes entre a expressão imuno-histoquímica de Twist e Caderina-E na amostras de epitélio oral, epitélio displásico e nos espécimes de carcinoma epidermóide oral. Adicionalmente, foi observada a relação inversa entre Twist e a Caderina-E nas linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, sendo este evento constatado pelo decréscimo nos níveis protéicos da Caderina-E frente a uma elevação de Twist. Estes resultados sugerem um importante papel de Twist na progressão do carcinoma epidermóide oral, e juntamente com a Caderina-E, pode representar um relevante marcador biológico do câncer oral.

Palavras-chave: Fator de transcrição Twist. Caderinas. Leucoplasia. Câncer oral.

ABSTRACT

Silva BSF Analysis of Twist, E-cadherin and p-Akt expression in oral squamous cell carcinoma progression [thesis]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2011.

The oral carcinogenesis is a multi-stage process, where genetic components leads to deregulation of cell signaling pathways that control basic cellular functions such as division, differentiation and cell death. One way to understand the biological nature of cancers, besides the clinical course, is through understanding the process of progression and metastasis of these neoplasms. This study aimed to evaluate the role of Twist protein in the development and progression of oral squamous cell carcinomas. With this proposal, was also evaluated the involvement of E-cadherin and p-Akt proteins, and its possible interaction with Twist in the process of oral carcinogenesis. The work in question examined the immunohistochemical expression of these proteins in 30 specimens of oral dysplasia, 20 oral squamous cell carcinoma and 10 normal oral mucosa, and also evaluated the possible interrelationship of these proteins in lines derived from squamous cell carcinoma of head and neck by means of Western blotting assays and immunofluorescence. The results of this study showed an inverse relationship between Twist and E-cadherin since the earliest stages of oral carcinogenesis. These results were based on the presence of significant differences between the immunohistochemical expression of Twist and E-Cadherin in samples of oral epithelium, dysplastic epithelium and in specimens of oral squamous cell carcinoma. In addition, we observed the inverse relationship between Twist and E-Cadherin in the lines of squamous cell carcinoma of head and neck; this event was evidenced by the decrease in protein levels of E-Cadherin forward to a high of Twist. These results suggest an important role of Twist in the progression of oral squamous cell carcinoma, and along with E-cadherin may represent a relevant biomarker of oral cancer.

Keywords: Twist transcription factor. Cadherins. Leukoplakia. Oral cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1	Alterações histológicas presentes no epitélio oral que possivelmente precedem o câncer oral Fonte: Lippman Hong (2002).....	25
Figura 2.2	Ilustração da participação de Twist na aquisição do fenótipo invasivo. Fonte: Urakami et al. (2008).....	28
Figura 2.3	Sinalização celular possivelmente envolvida na transição-epitélio mesenquimal Fonte: Wallerand et al. (2009).....	29
Figura 2.4	Ilustração das vias de sinalização celular PI3K/Akt e NFkB. Fonte: BioCarta.com.....	33
Figura 5.1	Expressão imuno-histoquímica da proteína TWIST. (A) Epitélio normal (200 X), (B) Displasia leve, (C) Displasia moderada, (D) Displasia intensa e (E) Carcinoma epidermóide (400 X).....	52
Figura 5.2	Expressão imuno-histoquímica da proteína caderina-E. (A) Displasia leve, (B) Displasia moderada, (C) Displasia intensa e (D) Carcinoma epidermóide (400 X).....	53
Figura 5.3	Expressão imuno-histoquímica da proteína p-Akt. (A) Epitélio normal (200 X), (B) Displasia leve, (C) Displasia moderada (200 X), (D) Displasia intensa e (E-F) Carcinoma epidermóide (400 X).....	55
Figura 5.4	A, B) Imunofluorescência por dupla marcação-Localização e expressão das proteínas TWIST (Vermelho) e caderina-E (Verde)na linhagem celularSCC-25.....	57
Figura 5.5	(A, B) Imunofluorescência por dupla marcação-Localização e expressão das proteínasTWIST (Vermelho) e caderina-E (Verde) na linhagem celular FADU.....	58
Figura 5.6	(A, B) Imunofluorescência -Localização e expressão da proteína p-Akt na linhagem celular SCC-25.....	59
Figura 5.7	Imunofluorescência -Localização e expressão da proteína p-Akt na linhagem celular FADU.....	60
Gráfico 5.1	Números (%) da positividade da proteína Twist de acordo com o tecido (p= 0,004).	51

Gráfico 5.2	Números (%) da positividade da proteína P-Akt de acordo com o tecido (p= 0,004).....	54
Gráfico 5.3	Expressão das proteínas TWIST (p=0,023), caderina-E (p=0,024) e p-Akt (p=0,430) na linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (SCC-25 e FADU) analisadas pelo ensaio de Western Blotting. (Q) Queratinócito controle, (F) FADU e (SCC) SCC-25.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Critérios utilizados para identificação das displasias. Fonte: WHO (2005)....	22
Tabela 4.1	Anticorpos utilizados, clones, diluições e tempo de incubação	38
Tabela 4.2	Anticorpos utilizados, clones, diluições e tempo de incubação	43
Tabela 5.1	Distribuição da positividade por grupo em cada proteína	49
Tabela 5.2.a	Distribuição da amostra pelo valor da Proteína Twist com a Caderina	50
Tabela 5.2.b	Distribuição da amostra pelo valor da Proteína Twist com a P-AKT	50
Tabela 5.2.c	Distribuição da amostra pelo valor da Proteína Caderina com P-AKT	50
Tabela 5.3	Média, mediana e desvio padrão da quantificação por célula e em cada proteína	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO LITERATURA	19
2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE	19
2.2 LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E DISPLASIA EPITELIAL	20
2.3 DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO TUMORAL	24
2.4 TWIST	26
2.5 TWIST E P53	26
2.6 TWIST, WNT, β -CATENINA/CADERINA-E	27
2.7 TWIST, AKT E NF κ B	30
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 AMOSTRAS TECIDUAIS	36
4.2 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	37
4.3 AVALIAÇÃO DAS MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	39
4.4 CULTIVO CELULAR	40
4.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	41
4.6 WESTERN BLOTTING	42
4.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA	43
4.7.1 Dupla marcação	44
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5 RESULTADOS	47
5.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA TWIST, CADERINA-E E P-AKT	47
5.2 WESTERN BLOTTING TWIST, CADERINA-E E P-AKT	48
5.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA TWIST, CADERINA-E- E P-AKT	49
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO A	69

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide é a neoplasia maligna mais frequente na cavidade oral, orofaringe, seios maxilares, e laringe, correspondendo à 90% dos tumores malignos que acometem essas regiões (Ou et al., 2008). Aproximadamente 500.000 novos casos desta neoplasia são diagnosticados por ano no mundo, sendo que um número expressivo de pacientes, no momento do diagnóstico, já apresentam metástases nodais à distancia. Por esse motivo, o carcinoma epidermóide oral exibe uma alta taxa de morbidade (Forastiere et al., 2008), sendo uma das maiores causas de morte no Brasil (INCA).

A carcinogênese oral é um processo multifásico, onde componentes genéticos levam a desregulação de vias de sinalização celular que controlam funções celulares básicas, como divisão, diferenciação e morte celular (Jeffries et al., 1999). Anos atrás, acreditava-se que a gênese do carcinoma epidermóide oral estava relacionada a poucos eventos genéticos, por volta de seis a dez alterações, que possivelmente eram as responsáveis pela iniciação e promoção dessa patologia (Sindransky, 1995; Todd et al., 1997). Atualmente sabe-se que essas alterações são mais complexas do que se teorizava, envolvendo diversos mecanismos ainda pouco compreendidos.

Twist é um fator de transcrição altamente conservado que pertence à família das proteínas *basic helix-loop-helix*, que através da sua repressão da caderina-E atua como um grande regulador do fenótipo mesênquimal. A expressão elevada de Twist têm sido encontrada em uma grande variedade de neoplasias malignas, como nos cânceres de mama, próstata, gástricos, de bexiga e nos rabdomiossarcomas. Esta superexpressão têm sido relacionada a tumores em estágios mais avançados com um maior potencial metastático (Zhang et al., 2007), e recentemente foi associada a eventos que regem a transformação maligna de linfócitos T, melanócitos (Hoek et al., 2004) e tecido prostático (Yuen et al., 2007). Pouco se sabe sobre o papel de Twist nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, no entanto, estudos recentes demonstram que este fator de transcrição parece estar associado à metástase nestas neoplasias (Ou et al., 2008).

Alguns estudos relatam uma coexpressão de Twist e p-Akt em adenocarcinomas de mama e carcinomas nasofaríngeos, sendo a expressão destas

proteínas relacionadas a tumores em estágios mais avançados, e conseqüentemente, considerados de pior prognóstico (Cheng et al., 2007; Zhang et al., 2007). Por isso, e por similaridades em seus papéis nos eventos tumorais, atualmente acredita-se em uma possível influência de Twist nos níveis de p-Akt.

Sabendo-se que o carcinoma epidermóide é uma doença de cunho genético, e a investigação da sua biologia nas últimas décadas rendeu a descoberta de uma gama de marcadores moleculares que podem ser usados como alvos terapêuticos e preditivos prognósticos, torna-se lícita a investigação do papel de Twist nos eventos que cercam o desenvolvimento e a progressão dos carcinomas epidermóides orais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE

Os carcinomas epidermóides são neoplasias malignas que se originam das células do epitélio estratificado de revestimento da cavidade oral, do esôfago, orofaringe, trato respiratório, trato digestivo, colo de útero e pele, sendo encontrados também em regiões susceptíveis a metaplasia escamosa, como pulmões e mamas (Moral; Paramio, 2008). Na cavidade oral, o carcinoma epidermóide, é a neoplasia maligna mais freqüente (Ou et al., 2008).

No Brasil, estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011) para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam 489.270 novos casos de câncer. Os cânceres da cavidade oral, representados pelos carcinomas epidermóides de lábio e orofaringe, corresponderão à 3% de todos os casos diagnosticados, totalizando 14.120 novos casos desta neoplasia no país. Apesar da evolução dos tratamentos para os cânceres em geral, a sobrevida dos pacientes que apresentam o carcinoma epidermóide oral permanece pobre, principalmente por esta neoplasia apresentar alta capacidade de metástases à distância (Williams, 2000).

A carcinogênese oral é um processo multifásico, onde componentes genéticos levam a desregulação de vias de sinalização celular que controlam funções celulares básicas, como divisão, diferenciação e morte celular (Jeffries et al., 1999). Anos atrás, acreditava-se que a gênese do carcinoma epidermóide oral estava relacionada a poucos eventos genéticos, por volta de seis a dez alterações, que possivelmente eram as responsáveis pela iniciação e promoção dessa patologia (Sindranski, 1995; Todd et al., 1997). Atualmente sabe-se que essas alterações são mais complexas do que se teorizava, envolvendo diversos mecanismos ainda pouco compreendidos.

O câncer, de um modo geral, é originado de células que apresentam acúmulos de mutações em genes responsáveis pelos controles da proliferação celular, morte celular e reparo de DNA (Moral; Paramio, 2008). Alterações nas funções destes genes resultam em células que apresentam vantagem no potencial

de crescimento em comparação as células normais, levando a um descontrole na proliferação e/ou diminuição na apoptose (Hanahan; Weinberg, 2000).

Pesquisas envolvendo os cânceres de um modo geral têm gerado conhecimentos que podem ser importantes no que tangem as estratégias de tratamento. Avanços de cunho genômico, proteômico e molecular tem gerado muitos possíveis candidatos como marcadores biológicas em diversas neoplasias (Wallerand et al., 2010). Uma das maneiras de compreender a natureza biológica (celular e molecular) dos cânceres, além do curso clínico, é através do entendimento do processo de progressão e metástase destas neoplasias. A metástase é um processo biológico complexo relacionado a alterações genéticas e a desregulações em vias de sinalização celular, estas acarretam mudanças fenotípicas que conferem uma capacidade de crescimento invasivo das células neoplásicas (Hotz et al., 2007).

A transição epitélio-mesênquimal é um evento recentemente implicado a metástase tumoral. Esse processo é caracterizado pela alteração da expressão de componentes estruturais epiteliais por componentes mesênquimais que tornam viável a perfusão das células neoplásicas epiteliais pelos tecidos adjacentes. As células sob esse processo perdem sua polaridade basal e apresentam alterações fenotípicas, ganhando maior capacidade de migração através da matriz extracelular (Shibata et al., 2008; Smit; Peeper, 2008; Hotz et al., 2007; Yuen et al., 2007; Zhang et al., 2007).

Atualmente atribuiu-se ao fator de transcrição Twist um importante papel no processo de metástase tumoral, sendo sugerido que Twist, juntamente aos fatores Snail e SIP1, agem como repressores da caderina-E promovendo a transição epitélio-mesênquimal e conseqüentemente a invasão e metástase das células neoplásicas, sendo estes, considerados eventos chave da progressão tumoral (Smit; Peeper, 2008; Shibata et al., 2008; Fondreville et al., 2009; Hotz et al., 2007; Luo et al., 2008; Yuen et al., 2007; Zhang et al., 2007).

2.2 LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E DISPLASIA EPITELIAL

Grande parte dos carcinomas epidermóides orais são precedidos por alterações visíveis da mucosa oral (Pitiyage et al., 2009). Essas alterações podem

variar desde lesões de coloração branca a avermelhada, podendo ser planas ou rugosas. Tais lesões podem ser consideradas potencialmente malignas por apresentarem alterações que são relacionadas a uma maior probabilidade de desenvolvimento de uma neoplasia maligna em comparação aos tecidos normais (WHO, 2005).

O maior potencial de transformação maligna destas lesões, representada por estas alterações clínicas, tem corroborado com a presença de alterações cromossômicas, genômicas e moleculares similares as encontradas no carcinoma epidermóide invasivo (Mithani et al., 2007).

Dessa forma, tais alterações clínicas devem ser levadas em consideração no que tange a prevenção do carcinoma epidermóide (Warnakulasuriya et al., 2008).

A leucoplasia é considerada a lesão potencialmente maligna mais freqüente na mucosa oral, com uma taxa de 2 a 5% de transformação maligna (Pitiyage et al., 2009). Essa lesão é definida como uma placa branca que não pode ser caracterizada clínica e histologicamente como qualquer outra lesão branca, ou seja, é um diagnóstico clínico de exclusão (WHO, 2005) Igualmente ao carcinoma epidermóide oral, a leucoplasia apresenta o tabaco como principal fator etiológico (Napier ; Speight, 2008).

Pelo menos dois tipos de leucoplasias são reconhecidos atualmente na literatura, sendo uma denominada homogênea e a outra não-homogênea. Esta distinção é estritamente clínica, baseada em algumas características como, a espessura da placa e a coloração da superfície da lesão. A leucoplasia homogênea é uniformemente lisa, fina e apresenta fissuras rasas na camada superficial de queratina. Este tipo clínico da leucoplasia é relacionado com um baixo risco de transformação maligna. Já no tipo não-homogêneo este risco é considerado maior (Warnakulasuriya et al., 2008). Existe um consenso na literatura de que tal classificação clínica das leucoplasias, dividindo-as em homogêneas e não-homogêneas, é imprecisa e possui um valor prognóstico limitado. Entretanto, lesões mistas, que apresentam tanto placas brancas quanto áreas avermelhadas, devem realmente ser consideradas na avaliação do risco de transformação maligna, pois tais lesões apresentam um risco real maior de transformação maligna. Estas lesões são denominadas clinicamente como eritroleucoplasias (Warnakulasuriya et al., 2008). Outra lesão considerada potencialmente maligna é a eritroplasia, que

consiste em uma placa vermelha que não pode ser classificada clínica ou histologicamente como qualquer outra lesão conhecida. As eritroplasias isoladas são relativamente incomuns, sendo as eritroleucoplasias as manifestações mais comuns (Warnakulasuriya et al., 2008). Os critérios histológicos que avaliam as alterações celulares e teciduais presentes nestas lesões são baseadas em anormalidades relacionadas a atipia celular e a perda da maturação normal do epitélio, ocasionando alterações morfológicas e estruturais que denotam um potencial de malignidade. Tais alterações são denominadas displasias epiteliais (Pityage et al., 2009).

As displasias epiteliais são consideradas alterações precursoras dos carcinomas epidermóides orais. A transformação maligna varia bastante em lesões que apresentam displasias, com um índice em torno de 6 a 36%. A graduação histológica das displasias ainda é uma ferramenta importante como preditivo de transformação maligna oferecendo bases para nortear a conduta clínica (Smith et al., 2009).

Os critérios utilizados para categorização das displasias levam em consideração as alterações arquiteturais e citológicas presentes no tecido epitelial (Tabela 2.1). De acordo com a presença destas alterações as displasias são classificadas em leve, moderada e intensa (Warnakulasuriya et al., 2008).

Tabela 2.1 – Critérios utilizados para identificação das displasias. Fonte: WHO (2005).

Alterações arquiteturais	Alterações citológicas
Estratificação epitelial irregular	Variação anormal no tamanho do núcleo
Polarização invertida das células basais	Variação anormal na forma do núcleo
Projeções epiteliais em forma de gota	Variação anormal no tamanho da célula epitelial
Número aumentado de mitoses	Variação anormal na forma da célula (pleomorfismo)
Mitoses anormais nas camadas mais altas do epitélio	Alteração na relação núcleo/citoplasma
Queratinização prematura individual das células epiteliais	Figuras de mitose bizarras
Pérolas de queratina nas projeções epiteliais	Aumento do número de nucléolos e aumento no tamanho destes

De acordocom Warnakulasuriya et al. (2008) este amplo espectro de alterações histológicas do epitélio devem seguir os seguintes critérios para graduação histológica das displasias:

- Displasia leve – Em geral, apresentam alterações arquiteturais limitadas apenas ao terço inferior do epitélio, acompanhadas de uma atipia citológica mínima.
- Displasia moderada – Inicialmente, as alterações arquiteturais que se estendem do terço inferior ao médio do epitélio, servem como um sinal identificável deste estágio. No entanto, após a identificação deste sinal a atenção deve se voltar para o grau de atipia citológica. Ou seja, as lesões que apresentam alterações citológicas marcantes devem ser classificadas como displasias intensas, mesmo não se estendendo ao terço superior do epitélio. Alternativamente, lesões que apresentam alterações citológicas moderadas até o terço médio do epitélio devem ser classificadas como displasias moderadas.
- Displasia intensa – A identificação de uma displasia intensa começa com a visualização de um distúrbio arquitetural nas três camadas do epitélio, associada a atipia celular. Entretanto, como foram citado anteriormente, as alterações arquiteturais que compreendem apenas os terços médio e inferior do epitélio, e que apresentam considerável atipia celular, devem ser elevadas ao grau de displasia intensa.

Já foi demonstrado que acúmulos de alterações genéticas são responsáveis pela transformação maligna (Mithani et al., 2007). Na mucosa oral, isso reflete em uma série de mudanças que caracterizaram as displasias epiteliais. No entanto, a progressão de eventos genéticos envolvidos na transformação maligna não foi completamente elucidada. Ainda não se sabe o significado prognóstico da detecção precoce das alterações genéticas nos tecidos displásicos, contudo, observou-se que tais alterações estão presentes nestes epitélios displásicos e em tecidos marginais ao carcinoma epidermóide. Isto sugere uma relação entre estas mutações no desenvolvimento das lesões potencialmente malignas, e consequentemente, no desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral (Warnakulasuriya et al., 2008).

Um número crescente de publicações vem abordando as possíveis alterações moleculares presentes nas lesões potencialmente malignas, em que

esses achados, podem representar uma base mais sólida no que tange a avaliação do prognóstico destas lesões (Srinivasan; Jewell, 2001; Kilpi et al., 1996; Turatti et al., 2005; Torres-Rendon et al., 2009; Oliver; Macdonald, 2001; Izzo, 1998; Papadimitrakopoulou et al., 2009; Murti et al., 1998; Cruz et al., 1998; Kovesi et al., 2006; Soni et al., 2005; Jordan et al., 1998; Shibata et al., 2005; Sun et al., 2005; Zhang et al., 2008a; Mutirangura, 1996; Kannan et al., 1997; Rosin, 2000; Mao et al., 1996; Partridge et al., 1999).

2.3 DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO TUMORAL

Como foi discutido nos parágrafos anteriores, o desenvolvimento tumoral do carcinoma epidermóide se dá por um acúmulo de alterações genéticas nas células epiteliais. Seu exato mecanismo ainda não foi completamente elucidado, e por isso se faz necessária a identificação de genes e proteínas possivelmente responsáveis envolvidas no processo de carcinogênese (Yokota,2000).

Essas alterações moleculares podem ser responsáveis pelas mudanças presentes nas células epiteliais, e que possivelmente, desencadeiam alterações histológicas identificadas como hiperplasias e displasias, sendo a última considerada um provável achado que precede o carcinoma epidermóide oral (Moral; Paramio, 2008). No caso do epitélio hiperplásico, observa-se uma proliferação aumentada de células morfolologicamente normais, sem apresentar alterações na arquitetura deste tecido. Já quando este epitélio se torna displásico são observadas alterações, tanto na arquitetura tecidual, quanto no aspecto citológico, sendo representadas pelas alterações presentes na Figura 2.1.

Figura 2.1 – Alterações histológicas presentes no epitélio oral que possivelmente precedem o câncer oral Fonte: Lippman ; Hong(2002).

A associação entre alterações genéticas e as alterações fenotípicas resultantes ainda não foram completamente compreendidas no processo de carcinogênese. No entanto, a literatura atual reconhece que exista uma correlação entre as alterações genéticas presentes nas células e as alterações fenotípicas durante o processo de progressão tumoral e metástase, e que a compreensão destes eventos é necessária para um melhor entendimento da biologia do câncer, com vistas a descoberta de novos alvos terapêuticos (Yokota, 2000).

Twist têm sido relacionado a aquisição de um fenótipo invasivo e sua superexpressão relacionada a tumores em estágios mais avançados e com um maior potencial metastático (Zhang et al., 2007). Recentemente, Twist foi associado a eventos que regem a transformação maligna de linfócitos T, melanócitos (Hoek et al., 2004) e tecido prostático (Yuen et al., 2007). No entanto, pouco se sabe sobre o papel de Twist nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, sendo que apenas poucos estudos sugerem que este fator de transcrição pode estar associado à metástases nestas neoplasias (Ou et al., 2008).

2.4 TWIST

As proteínas Twist são fatores de transcrição hélice-loop-hélice básicos (*basic helix-loop-helix*) altamente conservados que exercem importantes funções regulatórias durante a embriogênese (Zhang et al., 2007).

A função de Twist em células humanas foi primeiramente identificada na síndrome de Saethre-Chotzen, uma condição autossômica dominante que é caracterizada pela presença de craniosinostose. Nesta condição, mutações no gene Twist são responsáveis pela inativação da proteína, de mesmo nome, nos osteoblastos, levando a uma ossificação prematura das fontanelas. Foi demonstrado ainda, que Twist é um importante regulador da diferenciação osteoblástica e apoptose nesta síndrome (Guenou et al., 2006).

A superexpressão de Twist vem sendo relatada em uma grande variedade de tumores (Ansieau et al., 2008; Smit ; Peeper, 2008; Shibata et al., 2008; Fondreville et al., 2008; Hotz et al., 2007; Luo et al., 2008; Yuen et al., 2007; Zhang et al., 2007), e o seu papel na progressão tumoral e metástase convincentemente demonstrado na literatura (Wallerand et al., 2010; Ou et al., 2008; Hotz et al., 2007; Zhang et al., 2007).

Apesar do papel de Twist no desenvolvimento e progressão do câncer não ser completamente compreendida em nível molecular, um considerável número de estudos sugerem sua participação como regulador de diversas vias de sinalização celular envolvidas na carcinogênese. Dentre estas vias estão a do p53 (Shiota et al., 2008), Wnt (Howe et al., 2003), NFkB (Sasic et al., 2003), Akt (Cheng et al., 2007), e a transição epitélio-mesenquimal via complexo catenina-caderina (Zidar et al., 2008).

2.5 TWIST E P53

p53 é um supressor tumoral que possui como função principal evitar danos ao DNA, funcionando como um supressor de genes responsáveis pela progressão do ciclo celular (Harris ; Hollstein, 1993). Mutações do gene p53 têm sido implicadas no

desenvolvimento de mais de 50% de todos os cânceres humanos. A maioria dessas alterações surgem como mutações *missense* que estão estreitamente correlacionadas com a superexpressão da proteína p53 (Greenblatt et al., 1994). No carcinoma epidermóide oral, alguns estudos apontam que a expressão da proteína p53 mutada parece ter um importante significado prognóstico (Nylander et al., 1995; Shin et al., 1996; Shiraki et al., 2005).

A interação direta de Twist com o supressor tumoral p53 foi recentemente demonstrada por Shiota et al. (2008) em células de adenocarcinoma prostático em cultura. Através deste trabalho, os autores observaram o papel inibitório de Twist na expressão do gene p53. Notou-se ainda, que essa interação se baseava na influência de Twist com o domínio ligante (E-box) de p53 e a supressão da ação de ligação ao DNA do gene p53. Os autores ressaltaram que a ativação transcricional de p21, realizada pelo p53, foi suprimida significativamente sob a ação de Twist.

2.6 TWIST, WNT, β -CATENINA/CADERINA-E

Wnt representa uma ampla família de proteínas ligantes altamente conservadas que são muito importantes para o desenvolvimento normal das células. Wnt se liga a receptores de membrana plasmática e inicia sua participação nas cascatas de sinalização intracelular. Esta sinalização é responsável pelo controle de uma grande variedade de processos no desenvolvimento embrionário e a homeostase durante a vida adulta, isso inclui um controle da proliferação celular. Seus efeitos são amplos e significativos, como também, complexos. Tradicionalmente, a sinalização promovida por Wnt é categorizada em canônica (dependente de β -catenina) e não-canônica (não-dependente de β -catenina) (Najdi et al., 2011).

A superexpressão de Twist no câncer parece estar relacionada com a inibição da diferenciação celular, promovendo assim, a progressão tumoral (Figura 2.2). Alguns estudos apontam que este processo provavelmente se dá por meio da via de sinalização celular Wnt (Zhang et al., 2007; Howe et al., 2003; Urakami et al., 2006), onde a sinalização de Twist pode de alguma forma influenciar a inativação de

antagonistas de Wnt, como Wif-1, sFRP-1 e sFRP-5 (Urakami et al., 2006). Em carcinomas gástricos, foi constatado que Twist parece estar relacionado ao processo de migração e metástase das células tumorais através da via de sinalização Wnt, afetando os níveis de MMP-2, que por sua vez possuem importante papel nos processos de invasão e metástase por exercerem a proteólise das matrizes extracelulares (Luo et al., 2008).

Figura 2.2 – Ilustração da participação de Twist na aquisição do fenótipo invasivo. Fonte:Urakami et al. (2006).

Sabe-se também, que a via do Wnt é responsável pela estabilização da proteína bifuncional β -Catenina, sendo esta, relacionada a adesão celular. A expressão aberrante de β -Catenina está associada a perda do processo normal de diferenciação das células epiteliais, aquisição de um fenótipo invasivo, e um pior

prognóstico em um número grande de neoplasias (Karim et al., 2004). A interferência do mecanismo tumoral de adesão célula-à-célula, ocasionado pelo descontrole do complexo Caderina-E/ β -Catenina, pode representar um importante papel na carcinogênese (Schüssel et al., 2010). Wnt/ β -Catenina parecem estar envolvidos na progressão das displasias do epitélio oral, e segundo Ishida et al. (2007), a expressão celular alterada de β -Catenina pode representar um sinal de progressão maligna.

Wallerand et al. (2010) sugeriram que a transição epitélio-mesenquimal é sinalizada pela indução de receptores tirosino-quinases via Ras/PI3K. De acordo com essa teoria, TWIST influenciaria β -catenina via caderina-E estimulando a proliferação ou a transição epitélio mesenquimal. EGF via Ras estimularia a via PI3K induzindo a proliferação influenciando a β -catenina. Ras também influenciaria a transição epitélio-mesenquimal via Raf/MAPK (Figura 2.3).

Figura 2.3 – Sinalização celular possivelmente envolvida na transição-epitélio mesenquimal Fonte: Wallerand et al. (2010).

Em diversas neoplasias atribuí-se a TWIST o aumento da capacidade de invasão e metástase das células tumorais através da regulação-negativa da caderina-E e a indução a transição epitélio-mesênquimal (Yang et al., 2004). Com o intuito de investigar o significado da expressão de Twist no câncer de bexiga, Zhang et al. (2007) analisaram através de imunoistoquímica a expressão de Twist em espécimes teciduais de tumores primários de bexiga, lesões metastáticas e amostras de tecido normal. Os autores avaliaram uma possível associação da expressão de Twist ao estadiamento clínico dos tumores, a graduação histológica e o potencial metastático dessas lesões. Seus resultados indicaram que a expressão da proteína Twist era significativamente maior nos tecidos neoplásicos em comparação aos tecidos normais, indicando sua possível participação na progressão dessas neoplasias. Esse dado foi corroborado com o aumento da expressão de Twist relacionado a tumores em estágios avançados, com alto grau de malignidade. A expressão mais elevada de Twist em metástases tumorais em comparação aos tumores primários, e o decréscimo dos níveis de caderina-E, permitiram os autores concluir que Twist possui uma ação significativa no desenvolvimento e progressão do câncer de bexiga através da regulação negativa da caderina-E (Zhang et al., 2007).

Estudo semelhante foi conduzido por Yuen et al. (2007) avaliando 115 casos de cânceres prostáticos. Os autores concluíram que Twist pode ser empregado como marcador prognóstico para câncer de próstata de alto grau de malignidade. Neste modelo foi encontrada também a expressão aberrante da caderina-E associada à alta expressão de Twist, sugerindo que a combinação desses dois achados podem ser interpretados como preditivos de metástases à distância em tumores malignos dessa natureza.

2.7 TWIST, AKT E NFkB

O fator de transcrição nuclear- kB (NFkB) e o seu inibidor Ikb, são responsáveis pelo controle de transcrição de vários genes relacionados a proliferação celular e sobrevivência (Shen; Tergaonkar, 2009). NFkB representa um

grupo de proteínas estruturalmente conservadas que se ligam a múltiplas sequências de DNA e iniciam a transcrição de uma grande variedade de genes, incluindo genes que codificam citocinas, moléculas de adesão, fatores angiogênicos, enzimas e fatores antiapoptóticos (Hayden ; Glosch, 2004).

Uma série de trabalhos sugerem que a expressão elevada de NFkB pode estar envolvido no desenvolvimento e progressão de diversas neoplasias malignas como as mama, próstata, pâncreas, bexiga e cavidade oral (Cao; Karin, 2003; Ross et al., 2004; Sclabas et al., 2005; Levidou et al., 2008). A ação de NFkB se dá através da translocação deste fator de transcrição para o núcleo celular. No entanto, esse transporte ocorre apenas quando a atividade do repressor Ikb α é inibida pela ativação das quinases IKK. A fosforilação promovida por IKK nos resíduos específicos de serina Ser32 e Ser36 de Ikb α é capaz de liberar NFkB que ao ser transportado para o núcleo influencia a expressão de genes que envolvidos no controle do ciclo celular, como por exemplo a ciclina D1. A ativação de IKK pode ser realizada pela via PI3K/Akt. Esta ativação ocorre por meio fosforilação de IKK através da proteína Ras, que também é controlado por PI3K/Akt (Cao; Karin, 2003) (Figura 2.4).

De acordo com Ou et al. (2008), parece lícito sugerir que NFkB também influencia os níveis de Twist em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Esta afirmação baseou-se na correlação entre a expressão elevada de CXCR4 e Twist encontrada neste estudo, associada ao controle exercido por NFkB em CXCR4 em outras neoplasias e ao controle exercido por NFkB em Twist em outros tecidos.

Akt, também conhecida como Pkb, representa uma família de proteínas serino-treonino quinases representadas por três isoformas: Akt1, Akt2 e Akt3 que compartilham grande homologia (Bellacosa et al., 1993).

As proteínas Akt mostram-se alteradas em uma grande variedade de tumores. Por exemplo, Akt1 é superexpressa em carcinomas de mama, ovário, próstata e de cabeça e pescoço. O mesmo ocorre a Akt2, que se mostra superexpressa em uma diversidade de neoplasias, como tumores de mama estrogênio positivos, tumores de ovário e de cabeça e pescoço (Sun et al., 2001). A literatura aponta a superexpressão de Akt3 relacionado apenas a tumores de mama estrogênio negativos, sendo sugeridos maiores estudos à respeito de sua participação no desenvolvimento de tumores (Yuan et al., 2000).

Uma das mais frequentes alterações celulares encontradas nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço é a superativação das vias de sinalização PI3K/Mtor, as quais são influenciadas ou exercem influência nos níveis de Akt. Esta proteína através da estimulação das vias supracitadas exerce controle de importantes processos celulares, tais como metabolismo, proliferação e apoptose, e com isso, controla a sobrevivência e o crescimento celular (Moral; Paramino, 2008).

Akt possui um papel central na via de sinalização regida por PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase). A ativação de Akt é um processo que envolve múltiplas fases relacionadas com o seu deslocamento para membrana plasmática e subsequente ativação. A família das proteínas Akt representa alvos principais de receptores de fatores de crescimento tirosino-quinases que utilizam a via de sinalização PI3K (Bellacosa, 2005). PI3K é ativada por receptores tirosino-quinases transmembrânicos que são influenciados por outros intermediadores de sinalização, como os oncogenes Ras e Proteínas G (Rodriguez-Viciano et al., 1994). Akt é fosforilada em um resíduo treonina no domínio catalítico por PDK1 quinase, a qual se liga a PIP3 resultando na ativação parcial de Akt. Desta forma, Akt torna-se totalmente ativada após subseqüentes fosforilações neste mesmo domínio, e quando isso ocorre, torna-se capaz de interagir com as proteínas responsáveis pela proliferação celular, como NFkB, ciclina D1 e p27, e também aos reguladores da apoptose Bad e caspase 9 (Figura 2.4) (Moral; Paramino, 2008; Bellacosa, 2005).

Figura 2.4 – Ilustração das vias de sinalização celular PI3K/Akt e NFκB. Fonte: BioCarta.com

Segundo Hong et al. (2009), a família de quinases Akt/PKB, que influenciam PI3K, e que estão envolvidas no desenvolvimento de muitos tipos de tumores, inclusive no carcinoma epidermóide oral, possuem um papel importante na regulação da transição epitélio-mesenquimal. De acordo com estes autores, a transição epitélio-mesenquimal induzida por Akt envolve uma ação nos níveis de NFκB, a superexpressão de Snail e Twist, e consequentemente a regulação negativa da caderina-E.

Cheng et al. (2007), na tentativa de compreender as bases moleculares da metástase dos cânceres de mama, sistematicamente selecionaram linhagens celulares derivadas de câncer de mama altamente invasivas, e através de ensaio por câmara de invasão, avaliaram a participação de Twist e Akt2 no desenvolvimento dessas neoplasias. Neste modelo neoplásico foi observado decréscimo nos níveis de E-caderina, aumento dos níveis de vimentina, fibronectina e $\beta 1$ integrina. O fator de transcrição Twist, e o proto-oncogene Akt2, apresentaram elevação dos seus níveis nas células invasivas, o que não foi constatado nas células tumorais originais, ou seja, as células que não possuíam maior habilidade de invasão. Interferências

nos níveis de Twist resultaram na alteração simultânea dos níveis da proteína Akt2, e da expressão de seu RNA mensageiro. Esses achados demonstram importante papel de Twist como controlador da transcrição de Akt2, além de exercer influência nos eventos de invasão e sobrevivência das células tumorais de mama (Elias et al., 2005; Cheng et al., 2008).

Em carcinomas nasofaríngeos, Twist parece exercer um efeito antiapoptótico nas células tumorais. Conferindo resistência as células neoplásicas aos agentes quimioterápicos, possivelmente através da associação com Akt. Sugerindo que Twist seja um potencial marcador para identificação de tumores que talvez sejam resistentes aos tratamentos quimioterápicos (Zhang et al., 2007).

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a participação da proteína Twist no desenvolvimento e progressão dos carcinomas epidermóides orais. Com tal proposta, também foi avaliada a participação das proteínas caderina-E e p-Akt, e sua possível interação com Twist no processo de carcinogênese oral. O trabalho em questão analisou a expressão imuno-histoquímica destas proteínas em 30 espécimes de displasia oral, 20 de carcinoma epidermóide oral e 10 de mucosa oral normal dos arquivos do serviço de patologia bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Este mesmo estudo analisou a possível inter-relação dessas proteínas em linhagens derivadas de carcinoma epidermóide oral por meio dos ensaios de Western Blotting e imunofluorescência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS TECIDUAIS

Para realização das reações de imuno-histoquímica presentes neste trabalho foram utilizadas amostras teciduais, fixadas em formol e parafinadas, dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Foram utilizados 30 casos contendo displasias epiteliais, distribuídos igualmente entre os diferentes graus (10 leves, 10 moderadas e 10 intensas), 20 casos de carcinoma epidermóide de diferentes localizações, e 10 amostras de tecido epitelial normal. Este protocolo de pesquisa foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo conforme descrito no protocolo FR-319707 – 13/2010 (Anexo).

Para a análise morfológica dos casos foram utilizados cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina sob microscópio ótico de luz. A avaliação histológica das displasias atentou-se a presença das seguintes figuras de atipia: perda de polaridade das células da camada basal; hiperplasia da camada basal; presença de projeções epiteliais em gota; aumento no número de mitoses; presença de mitoses nas camadas mais altas do epitélio; figuras de mitose atípicas; pleomorfismo nuclear e celular; hipercromatismo nuclear; alteração da relação núcleo/citoplasma; nucléolos proeminentes; queratinização individual celular; perda da estratificação normal do epitélio; perda de coesão celular.

Os classificação histológica das displasias seguiu os seguintes critérios adotados por Warnakulasuriya et al. (2008):

- Displasia leve – Apresentavam alterações arquiteturais limitadas apenas ao terço inferior do epitélio, acompanhadas de uma atipia citológica mínima.

- Displasia moderada – As alterações arquiteturais se estendiam do terço inferior ao médio do epitélio. As lesões que apresentavam alterações citológicas marcantes foram classificadas como displasias intensas, mesmo não se estendendo ao terço superior do epitélio. Alternativamente, lesões que apresentavam alterações citológicas moderadas até o terço médio do epitélio foram classificadas como displasias moderadas.

- Displasia intensa – Foram consideradas displasias intensas os casos que apresentaram um distúrbio arquitetural nas três camadas do epitélio, associada a atipia celular. Entretanto, como foi citado anteriormente, as alterações arquiteturais que compreendiam apenas os terços médio e inferior do epitélio, e que apresentavam considerável atipia celular, foram elevadas ao grau de displasia intensa.

Os graus de displasia epitelial foram determinados por dois patologistas orais independentes usando os critérios descritos anteriormente. Na ocorrência de discrepâncias na classificação dos casos, os mesmos eram novamente analisados e discutidos entre os observadores, para depois se instituir uma avaliação final do caso.

4.2 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para as reações foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina e os cortes submetidos aos anticorpos anti-Twist, anti-caderina-E, e anti-p-Akt. Para realização desta metodologia foram preparados, a partir do material embocado em parafina, cortes de 3 µm de espessura dos espécimes teciduais, estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com organo silano para o aumento da adesividade entre o corte tecidual e a lâmina.

Após essa etapa, os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, sendo um a 60 °C por 30 minutos, e outro em temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanóis, passando por três banhos de etanol absoluto, etanol a 95%, 90%, 85% e 80% por 3 minutos cada. Após a reidratação foi realizada a remoção do pigmento formólico através de

incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%), por 5 minutos.

Posteriormente, os cortes foram imersos em água destilada por 10 minutos, seguido por mais duas lavagens com água destilada. Após essa etapa, os cortes receberam tratamento para recuperação antigênica. Para esse tratamento, os cortes que seriam submetidos aos anticorpos anti-caderina-E e anti-p-Akt foram mergulhados em uma solução de ácido cítrico monoidratado 10mM, pH 6.0 em banho Maria por 30 minutos a 95°C. Nos casos que seriam incubados com Twist, a recuperação antigênica se deu através da imersão em solução de ácido cítrico monoidratado 10 mM (pH 6.0) a 95°C, em microondas por 15 minutos, dividido em três ciclos de 5 minutos cada. Ao final da recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados durante 10 minutos em água destilada, seguida de mais duas lavagens, para posteriormente ser realizada a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual.

O bloqueio da peroxidase endógena das lâminas submetidas aos anticorpos anti-Twist e anti-p-Akt foi efetuada através da imersão das lâminas, por duas vezes, em uma solução na proporção de 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol por 15 minutos cada. A recuperação antigênica das lâminas que seriam incubadas com o anticorpo anti-caderina-E, por esse ser um marcador de membrana citoplasmática, seguiram um protocolo diferente sem a utilização de metanol. Em continuidade, repetiu-se a lavagem em água destilada, seguida pela imersão dos cortes por três vezes em solução de Tris pH 7.6, por 5 minutos. A diluição e o tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados neste estudo foram otimizados como descrito na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Anticorpos utilizados, clones, diluições e tempo de incubação

Anticorpo	Diluição	Tempo de incubação
Twist (clone H81 – Santa Cruz)	1:150	Overnight
Caderina-E (BD – Transduction)	1:1000	40 minutos
p-Akt (Akt 1/2/3 – Santa Cruz)	1:150	40 minutos

Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi utilizado o sistema do kit LSAB+ (DAKO, Carpinteria, CA, USA) em incubações de 30 minutos

cada. As reações foram reveladas através da incubação por 10 minutos com a substância diaminobenzidina (Liquid DAB+, K3468, DAKO, Carpinteria, CA, USA). Em seguida, os cortes foram lavados com Tris e água deionizada para remoção de excessos da substância de revelação, seguida pela realização de contra-coloração com hematoxilina de Mayer.

Todas as reações imuno-histoquímicas deste estudo foram realizadas utilizando-se controles positivos e negativos. Nos casos submetidos a investigação da expressão de Twist foi utilizado como controle positivo um espécime de adenocarcinoma de mama metastático. No caso da Caderina-E foram utilizados amostras de epitélio normal da mucosa oral. Os próprios casos de carcinoma epidermóide oral foram utilizados como controle positivo para p-Akt nas reações realizadas nas amostras de epitélio oral normal e nas displasias. O controle negativo foi realizado omitindo-se apenas o anticorpo primário da reação em questão. Após a conclusão das reações os cortes foram desidratados em cadeias ascendentes de etanóis, diafanizados em xilol e montados com lâminulas.

4.3 AVALIAÇÃO DAS MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Os espécimes submetidos às reações de imuno-histoquímica foram avaliados por um sistema de pontuação quantitativa e qualitativa com o intuito de reduzir possíveis distorções relacionadas com a heterogeneidade das amostras. As lâminas foram observadas em microscópio de luz com aumento final de 400x sob um foco fixo e com clareza de campo.

A avaliação da expressão imuno-histoquímica de Twist foi efetuada utilizando-se um sistema de graduação da marcação baseado no método descrito por Zhang et al. (2007). Esta avaliação levou em consideração 4 categorias que estimam a proporção de células positivas (<25%, 1; 25% à 50%, 2; 50% à 75%, 3; >75%, 4). A imunomarcação de Twist foi considerada positiva quando localizada no citoplasma ou no núcleo.

Para avaliação da expressão da Caderina-E foi realizado um único sistema de

graduação baseado na proporção de células marcadas, desta forma, a expressão deste marcador foi dividida em 4 categorias: (<25%, 1; 25% à 50%, 2; 50% à 75%, 3; >75%, 4). Este método de avaliação foi baseado no sistema descrito por Bremnes et al. (2002) e Zhang et al. (2007), apresentando apenas algumas modificações.

A imunoexpressão de p-Akt foi analisada através de um sistema que levou em consideração a porcentagem de células positivas: Marcação em mais de 75% das células (4); Marcação em 50 à 75% das células (3); Marcação em 25 à 50% das células (2); Marcação em menos de 25% das células (1).

As expressões destes três marcadores foram avaliadas por dois patologistas independentes, sem acesso a maiores informações dos casos analisados. Na ocorrência de discordâncias entre os resultados avaliados, os casos discordantes foram analisados novamente pelos mesmos patologistas para obtenção de um julgamento final sobre o resultado do caso em questão.

4.4. CULTIVO CELULAR

Neste estudo foram utilizadas as linhagens celulares SCC-25 e FADU, derivadas do carcinoma epidermóide de língua e orofaringe respectivamente, adquiridas comercialmente do banco de células da ATCC (*American Type Culture Collection*). Com o objetivo de se comparar os resultados encontrados nas linhagens derivadas do carcinoma epidermóide oral, também foi utilizada neste estudo uma linhagem de queratinócitos estabelecida previamente em nossa disciplina através de cultivo primário (Klingbeil et al., 2010).

As células foram plaqueadas em frascos de 25cm² contendo 5 ml de DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO – USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, BR) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma) e mantidas em incubadora (Precision Scientific) 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. O crescimento celular foi monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Zeiss - Axiovert 25- Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e o meio de cultura trocado a cada 48 horas.

Após ocuparem 70% do frasco, o que se denomina subconfluência, as células foram subcultivadas. O meio de cultura do frasco foi removido e separado em tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada uma vez com solução fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS A), pH 7,2. Em seguida, as células foram separadas com 2ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA 1mM (Sigma) durante 5 minutos, a 37°C. A tripsina foi inativada por meio do soro fetal bovino contido no meio de cultura reservado anteriormente, e as células em suspensão transferidas para um tubo de centrifugação e centrifugadas a 300g por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi homogeneizado em 1ml de meio de cultura. Alíquotas da suspensão foram distribuídas em frascos de cultivo de 25 cm² contendo 6ml de meio de cultura, e novamente levadas de volta à estufa, dando origem a uma nova passagem da linhagem celular.

4.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Após a subconfluência (70% da área cultivável), o meio de cultivo celular foi removido e as células lavadas com PBS. Após esse procedimento, com o intuito de remover as células da placa, foi aplicado 1 ml de da solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA 1mM (Sigma) durante 5 minutos, a 37°C. As células em suspensão foram transferidas para um tubo de centrifugação e centrifugadas a 300g por cinco minutos em temperatura ambiente. Após aspiração do sobrenadante, as células foram ressuspensas em PBS (solução fosfato-salina, sem cálcio e magnésio) gelado e centrifugado por 2 min. Seguiu-se a remoção de todo PBS e o acréscimo de 300 µL do 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). As células foram ressuspensas em RIPA, e foram mantidas em tubo de centrifugação, em que este foi mantido em recipiente térmico contendo gelo no

seu interior pelo tempo de 10 min. Neste período as células foram ressuspensas vigorosamente por algumas vezes em meio ao tampão RIPA⁺. Passado esses procedimentos, os lisados celulares foram obtidos através da centrifugação a 13.000 rpm por 20 min e o sobrenadante separado e estocado a -80°C.

As proteínas do lisado foram quantificadas utilizando o método do ácido biocinconico com o kit BCA Protein Assay Kit da Pierce (Reagente B + Reagente A 1:50 + 2-20µl de amostra, analisados em espectrofotômetro). Esse método tem por princípio a reação de peptídios das amostras com o cobre (Cu²⁺) resultando na redução do mesmo, formando um complexo de peptídios com o cátion cuproso (Cu⁺). 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 (aparelho de ELISA-ELX 800 Bio-Tek Instruments, Inc.), no comprimento de onda de 562nm. Ou seja, quanto mais intensa for a cor púrpura, ocorrerá mais absorção de luz, significando maior quantidade de proteína.

Após a quantificação das proteínas totais das amostras, foram realizados cálculos para definição da quantidade a ser utilizada de cada uma desta no ensaio de western blotting, respeitando o valor de 20 µg de proteína por amostra.

4.6 WESTERN BLOTTING

As alíquotas do lisado contendo 20µg/ml de proteína total foram adicionadas ao tampão de amostra para concentração final de 1X. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e então submetidas à SDS-PAGE, sendo feita eletroforese à 120V por 180 minutos, em gel de acrilamida a 10% ou 12% de acordo com o peso molecular das proteínas estudadas. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad).

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi feita por eletro-transferência semi-seca em aparelho especial (Amersham mini VE). Com o tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) utilizado como recomendado pelo fabricante. A transferência foi feita com 60V por 180min. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio ou lavada e seca para posterior reação.

Para a imunorreação, foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em pó desnatado em TBST por 1-2h em temperatura ambiente, sob agitação ou com TBST com BSA no caso do anticorpo p-Akt. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida lavando-se a membrana com TBST. Os anticorpos de interesse foram diluídos em solução de bloqueio e aplicados nas concentrações e tempos de incubação descritos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Anticorpos utilizados, clones, diluições e tempo de incubação

Anticorpo	Diluição	Tempo de incubação
Twist (clone H81 – Santa Cruz)	1:100	Overnight à 4°C
Caderina-E (BD – Transduction)	1:2000	120 minutos
p-Akt (Akt 1/2/3 – Santa Cruz)	1:50	120 minutos

O procedimento de incubação com os anticorpos alvo deste estudo foi seguido por três lavagens com TBST sob agitação à temperatura ambiente, para remoção do anticorpo não-absorvido. O anticorpo secundário foi aplicado por 1 hora, diluído em solução de bloqueio e depois lavado em TBST 2X por cinco minutos cada.

A detecção colorimétrica foi realizada através do Kit Bio-Rad. Uma parte do diluente concentrado Opti-4CN foi adicionada a nove partes de água deionizada. Foram utilizados 0,25ml para cada cm² da membrana. Para cada 10ml do diluente preparado foi adicionado 0,2ml de substrato Opti-4CN, misturando-se bem e colocado-os sobre a membrana. A membrana foi incubada no substrato por até 30min, depois lavada em água deionizada por 15 minutos.

Após a secagem das membranas, as bandas foram analisadas pelo *software Imagej* os gráficos confeccionados pelo *software Microsoft Excel*.

4.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para avaliação de Twist nos fenômenos controlam a transição epitélio-mesenquimal foi analisada qualitativamente sua influência na localização da

caderina-E e p-Akt nas linhagens celulares SCC-25 e FADU através do ensaio de imunofluorescência nas referidas células em sub-confluência e em confluência.

As reações que objetivaram avaliar a imuno-localização de p-Akt foram realizadas da seguinte forma: As linhagens celulares foram cultivadas separadamente sobre as lamínulas de vidro em placas de seis poços (*six well*), obedecendo todos os procedimentos de cultivo descritos anteriormente. Após atingirem a quantidade desejada para o experimento, as mesmas foram lavadas com solução tampão fosfato-salina livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} (PBS), pH 7,2 e fixadas em metanol por 6 min a -20°C . As amostras passaram por 10 lavagens com PBS gelado e então incubadas com BSA 1% por 30 minutos, seguida pela incubação do anticorpo primário, anti-mouse p-Akt (p-Akt 1/2/3 Santa Cruz) 1:50 por 60 minutos. Após nova lavagem foi realizada incubação com anticorpo secundário anti-mouse conjugado à fluoresceína com diluição de 1:100 por 45 minutos (Amershan). Posteriormente foi realizada 5 lavagens em PBS e uma em água destilada. Depois destas etapas 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, Oberkochen, Alemanha).

4.7.1 Dupla marcação

Para realização das reações de imunofluorescência para avaliação da imuno-localização de Twist e caderina-E foi realizada a técnica de dupla marcação. Com tal finalidade foram utilizados anticorpos de origem (animais) diferentes, sendo Twist *rabbit*, sendo este conjugado a um complexo com coloração avermelhada sob o filtro de fluorescência específico, e caderina-E mouse, conjugado a um complexo com coloração esverdeada. Como descrito anteriormente, as linhagens celulares foram cultivadas separadamente sobre as lamínulas de vidro em placas de seis poços (*six well*). Após atingirem a quantidade desejada para o experimento, as mesmas foram lavadas com solução tampão fosfato-salina livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} (PBS), pH 7,2 e fixadas em metanol por 6 min a -20°C . As amostras passaram por 10 lavagens com PBS gelado, incubadas com BSA 1% por 30 minutos, seguida pela incubação do

anticorpo primário anti-mouse caderina-E (BD, Transduction) na concentração de 1:1000 por 60 min. Depois da incubação com o referido anticorpo as lamínulas foram lavadas 10 vezes com PBS gelado seguidas pela incubação com o complexo secundário anti-mouse conjugado à fluoresceína (Amershan) com diluição de 1:100 por 60 minutos em câmara escura. A partir deste estágio, todos os procedimentos foram realizados em ambiente escuro.

Após o término da primeira etapa da reação foram realizadas mais 5 lavagens das lamínulas em PBS seguida pela incubação com o anticorpo primário anti-rabbit Twist (H-81, Santa Cruz) na concentração de 1:50 por 60 minutos. Procedeu-se mais 5 lavagens com PBS e a incubação com o complexo secundário anti-rabbit (Dako) na concentração de 1:50 por 60 minutos. Posteriormente realizou-se mais 5 lavagens das lamínulas com PBS e em seguida incubação com fluorótopo Texas Red streptavidin (Dako) por 60 minutos. Após novas lavagens com PBS e água destilada, 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, Oberkochen, Alemanha).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística utilizada neste estudo foi realizada com o auxílio do programa computacional BioEstat 5.0 (Instituto Mamirauá, Belém, PA, Brasil). Possíveis diferenças nas expressões imuno-histoquímicas das proteínas Twist, Caderina-E e p-Akt entre os cinco grupos estudados (epitélio oral normal, displasia leve, displasia moderada, displasia intensa e carcinoma epidermóide oral) foram verificados pelo método de variância não-paramétrico *Kruskal-Wallis*. O teste de *Dunn* foi aplicado para verificação de quais grupos diferiam entre si significativamente. O teste de correlação de *Spearman* foi utilizado para determinar a possível existência de correlação na expressão de Twist, caderina-E e p-Akt.

Os ensaios de *Western blotting* foram realizados em triplicata para

realização de testes estatísticos. A expressão das proteínas quando comparadas dois a dois foram submetidas ao teste *Mann-Whitney*. Foram considerados estatisticamente significantes resultados com valor de $P < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA TWIST, CADERINA-E E P-AKT

O teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* demonstrou variância estatisticamente significativa ($p=0,004$) na imunoexpressão de Twist entre os cinco grupos avaliados (Epitélio normal, displasia leve, displasia moderada, displasia intensa e carcinoma epidermóide) (Tabela 5.1) (Gráfico 5.1). Quando comparados grupo a grupo, pelo teste estatístico de *Dunn*, observou-se diferença significativa na imunoexpressão de Twist entre o epitélio normal e carcinoma epidermóide ($p=0,004$), displasia leve e displasia moderada ($p<0,05$), e entre os grupos displasia leve e carcinoma epidermóide ($p=0,018$) (Tabela 5.1).

A expressão imuno-histoquímica de Twist nos espécimes de epitélio normal, e em todos os grupos que compreendem as displasias (displasia leve, moderada e intensa), foi encontrada predominantemente nas camadas basal e parabasal do epitélio, sendo essa expressão citoplasmática. Nos espécimes de carcinoma epidermóide, Twist apresentou uma distribuição difusa nas ilhas neoplásicas, exibindo expressão elevada em tumores pobremente diferenciados, principalmente de localização citoplasmática (Figura 5.1); entretanto, expressão nuclear também foi observada em alguns poucos casos.

Em relação a imunoexpressão da Caderina-E, foi observada variância estatisticamente significativa (kruskal-Wallis - $p<0,001$) entre os cinco grupos avaliados (Epitélio normal, displasia leve, displasia moderada, displasia intensa e carcinoma epidermóide) (Tabela 5.1). O teste estatístico de *Dunn* demonstrou diferença significativa na imunoexpressão da Caderina-E entre os grupos epitélio normal e displasia moderada ($p=0,001$), epitélio normal e displasia intensa ($p=0,002$), epitélio normal e carcinoma epidermóide ($p=0,001$), displasia leve e displasia moderada ($p=0,004$), displasia leve e displasia intensa ($p=0,014$), displasia leve e carcinoma epidermóide ($p=0,001$), displasia moderada e carcinoma epidermóide ($p<0,001$), e entre os grupos displasia intensa e carcinoma epidermóide ($p<0,001$) (Tabela 5.1).

A expressão da Caderina-E apresentou localização exclusivamente na membrana citoplasmática, sendo observada a perda gradual de expressão nas camadas basal e parabasal a medida que o grau de displasia aumentava (displasia leve, moderada e intensa). Esta proteína exibiu uma expressão heterogênea nos

espécimes de carcinoma epidermóide, onde sua expressão mostrou-se diminuída nos tumores provavelmente diferenciados (Figura 5.2).

A imunoexpressão de p-Akt, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis, demonstrou uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre os cinco grupos estudados (Epitélio normal, displasia leve, displasia moderada, displasia intensa e carcinoma epidermóide) (Tabela 5.1) (Gráfico 5.2). A comparação grupo a grupo pelo teste estatístico de *Dunn* rendeu os seguintes resultados: diferenças significantes entre os grupos epitélio normal e displasia leve ($p = 0,006$), epitélio normal e displasia moderada ($p = 0,003$), epitélio normal e displasia intensa ($p = 0,001$), epitélio normal e carcinoma epidermóide ($p < 0,001$), displasia leve e carcinoma epidermóide ($p < 0,001$), displasia moderada e carcinoma epidermóide ($p < 0,001$), displasia intensa e carcinoma epidermóide ($p < 0,001$) (Tabela 5.1).

A localização de p-Akt nos espécimes de epitélio normal foi observada exclusivamente no núcleo das células presentes nas camadas basal e parabasal. Nos grupos que compreendiam as displasias epiteliais (leve, moderada e intensa) p-Akt também exibiu expressão nuclear, no entanto, esta proteína estava presente em quase todas as camadas do epitélio. Por fim, no grupo carcinoma epidermóide, a imunoexpressão de p-Akt foi observada tanto em núcleo quanto no citoplasma, exibindo uma expressão difusa nas regiões centrais periféricas das ilhas neoplásicas. (Figura 5.3).

Com a utilização do teste de correlação de *Spearman* foi demonstrada correlação entre as proteínas Twist e Caderina-E ($r = -0,512$; $p < 0,001$) (Tabela 5.2.a, Twist e p-Akt ($r = 0,391$; $p = 0,002$) (Tabela 5.2.b) e Caderina-E e p-Akt ($r = -0,635$; $p < 0,001$) (Tabela 5.2.c).

5.2 WESTERN BLOTTING TWIST, CADERINA-E E P-AKT

Por meio do teste Kruskal-Wallis observou-se diferenças significantes na expressão de Twist entre a célula utilizada como controle (queratinócito) e as duas linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, FADU e SCC25 ($p < 0,05$). A caderina-E avaliadas nestas mesmas linhagens celulares demonstrou diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os três grupos avaliados (queratinócito, FADU e SCC-25). A proteína p-Akt foi a única que não demonstrou diferenças significantes na sua expressão entre os três grupos estudados (Tabela 5.3) (Gráfico 5.3).

5.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA TWIST, CADERINA-E E P-AKT

A proteína Twist, analisada por ensaios de imunofluorescência, demonstrou expressão restrita ao citoplasma nas linhagens de carcinoma epidermóide FADU e SCC-25 (Figuras 5.4, 5.5) A Caderina-E apresentou uma localização exclusiva na membrana citoplasmática, sendo observada, por meio da técnica de dupla marcação, a perda da sua expressão nas células que exibiam forte marcação para a proteína Twist (Figuras 5.4, 5.5). Nestes mesmos ensaios observou-se a expressão nuclear de p-Akt (Figuras 5.6, 5.7)

Tabela 5.1 – Distribuição da positividade por grupo em cada proteína

Twist	Normal ^N		Leve ^L		Moderado ^{M,L}		Intenso ^I		Carcinoma ^{N,L}		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Ausência	3	30,0	1	10,0	1	10,0	2	20,0	2	10,0	0,004
< 25	5	50,0	8	80,0	3	30,0	2	20,0	2	10,0	
25 I— 50	2	20,0	1	10,0	4	40,0	2	20,0	7	35,0	
50 I— 75	—	0,0	—	0,0	1	10,0	4	40,0	3	15,0	
> 75	—	0,0	—	0,0	1	10,0	—	0,0	6	30,0	
Total	10	100,0	10	100,0	10	100,0	10	100,0	20	100,0	
Caderina	Normal ^N		Leve ^{N,L}		Moderado ^{M,N,L}		Intenso ^{I,N,L}		Carcinoma ^{N,L,M,I}		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Ausência	—	0,0	—	0,0	—	0,0	—	0,0	7	35,0	<0,001
< 25	—	0,0	—	0,0	—	0,0	—	0,0	9	45,0	
25 I— 50	—	0,0	—	0,0	6	60,0	5	50,0	4	20,0	
50 I— 75	10	100,0	10	100,0	4	40,0	5	50,0	—	0,0	
Total	10	100,0	10	100,0	10	100,0	10	100,0	20	100,0	
P-Akt	Normal ^N		Leve ^{L,N}		Moderado ^{M,N}		Intenso ^{I,N}		Carcinoma ^{C,N,L,M,I}		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Ausência	7	70,0	1	10,0	1	10,0	—	0,0	1	5,0	<0,001
< 25	3	30,0	7	70,0	4	40,0	5	50,0	—	0,0	
25 I— 50	—	0,0	2	20,0	5	50,0	5	50,0	6	30,0	
50 I— 75	—	0,0	—	0,0	—	0,0	—	0,0	13	65,0	
Total	10	100,0	10	100,0	10	100,0	10	100,0	20	100,0	

Teste: Kruskal Wallis;

Letras Iguais indica a existência de Diferença Significativa em cada proteína

Tabela 5.2.a – Distribuição da amostra pelo valor da Proteína Twist com a Caderina

Twist	Caderina							
	Ausência		< 25		25 I— 50		50 I— 75	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausência	0	0,0	0	0,0	4	26,7	5	17,2
< 25	0	0,0	1	11,1	5	33,3	14	48,3
25 I— 50	1	14,3	5	55,6	2	13,3	8	27,6
50 I— 75	2	28,6	1	11,1	3	20,0	2	6,9
> 75	4	57,1	2	22,2	1	6,7	0	0,0
Total	7	100,0	9	100,0	15	100,0	29	100,0

$r = -0,512$; $p < 0,001$ (Correlação de Spearmann)

Tabela 5.2.b – Distribuição da amostra pelo valor da Proteína Twist com a P-Akt

Twist	P-Akt							
	Ausência		< 25		25 I— 50		50 I— 75	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausência	2	20,0	3	15,8	3	16,7	1	7,7
< 25	5	50,0	10	52,6	3	16,7	2	15,4
25 I— 50	3	30,0	3	15,8	5	27,8	5	38,5
50 I— 75	0	0,0	3	15,8	4	22,2	1	7,7
> 75	0	0,0	0	0,0	3	16,7	4	30,8
Total	10	100,0	19	100,0	18	100,0	13	100,0

$r = 0,391$; $p = 0,002$ (Correlação de Spearmann)

Tabela 5.2.c – Distribuição da amostra pelo valor da Proteína Caderina com P-Akt

Caderina	P-Akt							
	Ausência		< 25		25 I— 50		50 I— 75	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausência	1	10,0	0	0,0	4	22,2	2	15,4
< 25	0	0,0	0	0,0	1	5,6	8	61,5
25 I— 50	1	10,0	4	21,1	7	38,9	3	23,1
50 I— 75	8	80,0	15	78,9	6	33,3	0	0,0
Total	10	100,0	19	100,0	18	100,0	13	100,0

$r = -0,635$; $p < 0,001$ (Correlação de Spearmann)

Tabela 5.3 – Média, mediana e desvio padrão da quantificação por célula e em cada proteína

Proteína / Célula	Média	Desvio Padrão	Mediana	p
twist				
Queratinócito ^Q	0,0	*	0,0	0,023
Fadu ^F	23515,0	15585,0	14517,0	
SCC_25 ^S	11709,7	85,5	11757,0	
caderina				
Queratinócito ^Q	14581,7	1088,7	15088,0	0,024
Fadu ^F	0,0	*	0,0	
SCC_25 ^S	10418,3	1466,2	11095,0	
P-Akt				
Queratinócito	10198,0	10204,0	10202,0	0,430
Fadu	10211,0	10217,0	10215,0	
SCC_25	10224,0	10230,0	10228,0	

Teste: Kruskal Wallis;

* Devido a ocorrências de valores constantes não achou o desvio padrão;

Letras Iguais em cada proteína indica a existência de diferença significativa, pelo teste U Mann Whitney.

Gráfico 5.1 –Números (%) da positividade da proteína Twist de acordo com o tecido (p= 0,004)

Figura 5.1 –Expressão imuno-histoquímica da proteína TWIST. (A) Epitélio normal (200 X), (B) Displasia leve, (C) Displasia moderada, (D) Displasia intensa e (E) Carcinoma epidermóide (400 X)

Figura 5.2 – Expressão imuno-histoquímica da proteína caderina-E. (A) Displasia leve, (B) Displasia moderada, (C) Displasia intensa e (D) Carcinoma epidermóide (400 X)

Gráfico 5.2—Números (%) da positividade da proteína P-Akt de acordo com o tecido ($p= 0,004$)

Figura 5.3 –Expressão imuno-histoquímica da proteína p-Akt. (A) Epitélio normal (200 X), (B) Displasia leve, (C) Displasia moderada (200 X), (D) Displasia intensa e (E-F) Carcinoma epidermóide (400 X)

Gráfico 5.3 –Expressão das proteínas TWIST ($p=0,023$), caderina-E ($p=0,024$) e p-Akt ($p=0,430$) na linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (SCC-25 e FADU) analisadas pelo ensaio de Western Blotting. (Q) Queratinócito controle, (F) FADU e (SCC) SCC-25

Figura 5.4 –(A, B) Imunofluorescência por dupla marcação-Localização e expressão das proteínas TWIST (Vermelho) e caderina-E (Verde) na linhagem celular SCC-25

Figura 5.5 –(A, B) Imunofluorescência por dupla marcação-Localização e expressão das proteínas TWIST (Vermelho) e caderina-E (Verde) na linhagem celular FADU

Figura 5.6 –(A, B) Imunofluorescência -Localização e expressão da proteína p-Akt na linhagem celular SCC-25

Figura 5.7 –Imunofluorescência -Localização e expressão da proteína p-Akt na linhagem celular FADU

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento do Carcinoma epidermóide oral é relacionado a alterações genéticas que resultam na ausência dos mecanismos de controle da diferenciação e crescimento celulares (Pitiyage et al., 2009). Alterações genéticas encontradas nessas neoplasias malignas também parecem estar presentes nas lesões consideradas cancerizáveis, sugerindo um possível papel destes eventos no processo de transformação maligna (Pontes et al., 2009; Watanabe et al., 2009).

O presente estudo demonstrou diferenças significativas na expressão de Twist ($p=0,004$), p-Akt ($p<0,001$), e principalmente a caderina-E ($p<0,001$) desde os estágios mais precoces da carcinogênese oral. Tal afirmação é baseada na presença de diferenças significantes na expressão destas proteínas quando comparadas grupo a grupo (epitélio normal, displasia leve, displasia moderada, displasia intensa e carcinoma epidermóide). Twist parece estar relacionada a progressão do carcinoma epidermóide, haja vista que esta proteína demonstrou diferenças significantes na sua expressão, não só entre os espécimes de epitélio normal e de carcinoma epidermóide ($p=0,04$), mas também entre as displasias leves e moderadas ($p<0,05$), consideradas lesões que antecedem o desenvolvimento tumoral.

A caderina-E, juntamente com Twist, demonstrou ser um marcador promissor do processo de transformação neoplásica, sendo observadas diferenças em todos os estágios da evolução de uma displasia para um carcinoma epidermóide. Outro dado relevante é a presença de correlação da expressão deste dois marcadores no presente estudo ($r= -0,512$; $p < 0,001$).

Adicionalmente, foi observada a correlação entre Twist e a Caderina-E nas linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, sendo este evento constatado pelo decréscimo nos níveis protéicos da Caderina-E frente a uma elevação de Twist nestas linhagens celulares. Estes resultados sugerem um importante papel de Twist na progressão do carcinoma epidermóide oral, e juntamente com a Caderina-E, pode representar um relevante marcador biológico de lesões cancerizáveis.

Diversos trabalhos sugeriram uma ação repressora de Twist na transcrição do gene Caderina-E (Nelson ; Nusse, 2004; Hajra et al., 2002; Martin et al., 2005). No entanto, seu mecanismo de repressão e o seu papel na carcinogênese oral ainda não foram elucidados. As proteínas Twist, Slug e Snail parecem exercer um papel semelhante na repressão da caderina-E, e aparentemente a expressão desses repressores está vinculada com sinalização da β -Catenina.

Zhang et al. (2007) sugeriram que a superexpressão de Twist em neoplasias malignas pode ser responsável pelo bloqueio na diferenciação celular auxiliando a progressão tumoral, e que esse processo pode ser mediado pela via do Wnt. A via do Wnt é responsável pela estabilização da proteína bifuncional β -Catenina, e relacionada a adesão celular. A interferência neste mecanismo de adesão célula-à-célula, ocasionado pelo descontrole do complexo Caderina-E/ β -Catenina, pode representar um importante papel na carcinogênese (Schüssel et al., 2011).

O Complexo Wnt/ β -Catenina parece estar envolvido na progressão das displasias do epitélio oral (Ishida et al., 2007). Isto posto, a combinação destes achados com os resultados deste estudo sugerem que a ação de Twist na carcinogênese oral pode ser mediada via Wnt, e que o complexo Caderina-E/ β -Catenina pode ser influenciado por essa via.

Os ensaios de imunofluorescência realizados neste estudo demonstraram que a presença citoplasmática de Twist estava relacionada com a repressão da expressão membranosa da caderina-E, e a linhagem celular de carcinoma epidermóide de língua (SCC-25) parece ter uma estimulação autócrina/parácrina de Twist devido a supressão da caderina-E estar localizada apenas nas células que apresentam alta expressão da referida proteína. Já a linhagem celular de carcinoma epidermóide de orofarínge (FADU) parece apresentar uma expressão constitutiva de Twist, fazendo com que todas as células exibam uma depleção da expressão membranosa da caderina-E.

Este estudo também demonstrou correlação significativa na expressão imuno-histoquímica das proteínas Twist e p-Akt nos espécimes de mucosa oral normal, as displasias e o carcinoma epidermóide oral ($r=0,391$; $p=002$). No entanto, esta correlação não foi observada nos ensaios que avaliaram a expressão destas proteínas nas linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em comparação a amostras celulares de queratinócitos normais. De acordo com

Klingbeil et al. (2010), a utilização de vários fatores de crescimento adicionados a cultivo destes queratinócitos pode explicar os altos níveis de p-Akt, fazendo com que a expressão desta proteína nestas células demonstrem níveis semelhantes aos apresentados nas linhagens neoplásicas. Este dado sugere que tais fatores de crescimento parecem não influenciar os níveis de Twist nos queratinócitos normais, corroborando com os resultados deste estudo que demonstram que a estimulação desta proteína se dá aparentemente de forma autócrina ou parácrina.

A expressão imuno-histoquímica de Twist nas displasias foi observada predominantemente nas camadas parabasal e basal, regiões em que sabidamente as alterações displásicas se iniciam (Crissman; Zarbo, 1989). Nestas mesmas lesões observou-se a diminuição da expressão da caderina-E nas mesmas regiões do epitélio, demonstrando a relação inversa entre estas proteínas.

A progressão do carcinoma epidermóide oral pode estar associada com a perda da expressão da caderina-E, que resulta em um fenótipo mais invasivo (Wheelock et al., 2008). Twist age na transição epitélio-mesenquimal através da regulação negativa da caderina-E, promovendo a perda de adesão célula-à-célula causando uma remodelação dramática do citoesqueleto da célula epitelial, aumentando assim a motilidade celular (Luo et al., 2008). Isso pode explicar a presença de alterações fenotípicas evidentes nas células positivas para Twist nos casos de displasia epitelial e nos espécimes de carcinoma epidermóide avaliados neste estudo.

Twist é um fator de transcrição hélice-volta-hélice que demonstra uma importante ação no processo de metástase das células tumorais, conhecido também por induzir a transição epitélio-mesenquimal. Esta última, recentemente foi implicada como um evento chave nos processos de invasão e metástase tumorais, sendo estas, etapas indispensáveis na progressão neoplásica (Yuen et al., 2007).

A participação de TWIST na progressão e metástase tumoral foi descrita numa variedade de neoplasias, incluindo os cânceres de mama (Cheng et al., 2008), próstata (Yuen et al., 2007), pâncreas (Hotz et al., 2007), gástricos (Luo et al., 2008), colo de útero (Shibata et al., 2008), bexiga (Zhang et al., 2007; Fondreville et al., 2009) e de cabeça e pescoço (Ou et al., 2008; Hong et al., 2009). Entretanto, pouco

se sabe sobre o mecanismo de Twist na progressão do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

Em espécimes de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço a expressão imuno-histoquímica de Twist foi observada tanto no núcleo quanto no citoplasma, entretanto, não foi sugerida nenhuma teoria quanto a ação desta proteína nestas localizações (Ou et al., 2008). No presente estudo, Twist foi encontrado principalmente no citoplasma dos espécimes de mucosa oral normal, nos epitélios displásicos, e nos carcinomas epidermóides; contudo, foi observada também uma localização nuclear de Twist em alguns casos de carcinoma epidermóide. Nesta neoplasia a expressão de Twist parece estar relacionada com o grau de diferenciação celular, com uma expressão aparentemente elevada em tumores pobremente diferenciados.

De acordo com Yuen et al. (2007), a imunoexpressão citoplasmática de Twist está relacionada com a transformação neoplásica dos tecidos prostáticos, e esta expressão pode exercer uma regulação negativa do processo de diferenciação celular dos tumores prostáticos, enquanto a localização nuclear desta proteína exerce uma regulação positiva no processo de metástase. Nossos resultados demonstraram características semelhantes as citadas acima, demonstrando uma possível participação de Twist na progressão do carcinoma epidermóide e o seu possível valor como marcador prognóstico.

Atribuí-se a Twist uma ação primordial com fator de transcrição que regula positivamente os genes CXCR4 e CCR7 durante a metástase linfonodal, e a sua expressão aparentemente pode ser relacionada com o estágio clínico dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (Ou et al., 2008). Foi descrito que CXCR4 pode ser regulado positivamente via NFkB em carcinoma prostáticos e mamários (Ou et al., 2008; Kukreja et al., 2005). Adicionalmente, a ativação da via PI3K/Ak parece influenciar a transição epitélio-mesenquimal via CXCR4 (Onoue et al., 2006). Fortes evidências apontam que a via PI3K/Akt é necessária para ativação do NFkB induzida por TNF e interleucina 1 (IL-1), ou via proteína Ras através da ativação de IKK β (Li et al., 2002).

Recentemente foi apontada uma relação de Twist com a via de sinalização regida por Akt (Hong et al., 2009; Zhang et al., 2007). Ambas as proteínas parecem demonstrar características associadas com a regulação negativa da caderina-E e a

perda de adesão célula-à-célula na transição epitélio-mesenquimal (Yuen et al., 2007; Hong et al., 2009). O aumento da expressão de Twist pode influenciar a via PI3K/Akt através de mecanismos ainda não esclarecidos. Entretanto, esse *cross-talk* pode ser explicado pela possível interferência de Twist e p-Akt na via p53/MDM2 (Zhang et al., 2007).

Outro estudo recente apontou que a inibição do p-Akt pode induzir a reversão do processo de transição epitélio-mesenquimal, em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, por meio da interação com o NFkB, regulando negativamente a proteína Twist (Hong et al., 2009).

A proteína serina/treonina quinase Akt é uma efetora *downstream* da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) que encontra-se frequentemente apresenta expressão elevada em cânceres humanos (26). p-Akt foi apontado como um fator prognóstico independente em pacientes com carcinoma epidermóide oral (31), e recentemente a sua expressão foi atribuído um papel relevante na conversão de lesões potencialmente malignas em carcinomas epidermóides (Pontes et al., 2009). No referido trabalho, os autores demonstraram que a expressão de p-Akt é significativamente mais elevada em espécimes de carcinoma epidermóide em comparação a amostras de epitélio displásico e epitélio normal, sugerindo que o aumento na expressão desta proteína represente um evento precoce do processo de progressão para o câncer oral.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os apresentados por Pontes et al. (2009), demonstrando que a imunoexpressão de p-Akt nos espécimes de carcinoma epidermóide oral é significativamente maior em comparação com o epitélio oral normal e o epitélio displásico. Nesta avaliação, observou-se imunomarcagem no núcleo e no citoplasma, sendo que nas amostras de epitélio oral normal e nos grupos das displasias a expressão se restringia ao núcleo. Nas amostras teciduais de carcinomas epidermóides orais a expressão de p-Akt foi encontrada em ambos os comportamentos celulares, com predomínio citoplasmático em tumores menos diferenciados.

Nas linhagens celulares avaliadas a localização de p-Akt foi exclusivamente nuclear. Isso pode ser parcialmente explicado pelo fato de Akt, uma vez fosforilado por PDK1, uma proteína presente na membrana citoplasmática, poder apresentar

alguns dos seus alvos no núcleo celular, sendo estes alvos possivelmente responsáveis pela proliferação celular e prevenção da apoptose.

Adicionalmente, a expressão nuclear da proteína p-Akt parece exercer alguma influência no processo de progressão do carcinoma epidermóide por ser detectado nos processos mais precoces da carcinogênese oral com um padrão de expressão, e de localização, correlacionados com a progressão do processo maligno (epitélio normal, displasia epitelial, carcinoma *in situ* e carcinoma epidermóide oral) (Amornphimoltham et al., 2004). De acordo com um estudo conduzido Amornphimoltham et al. (2004) p-Akt pode exibir um padrão de marcação nuclear limitado as camadas basal e parabasal do epitélio normal, nuclear forte nos espécimes contendo displasia e nuclear e citoplasmática nas amostras de carcinomas *in situ*.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com esse estudo sugerem que:

1. A progressão do carcinoma epidermóide oral pode estar associada com a perda da expressão da caderina-E, que resulta em um fenótipo mais invasivo
2. TWIST, juntamente com a caderina-E, apresentam características que os colocam como candidatos a marcadores biológicos de lesões potencialmente malignas.
3. A expressão de TWIST parece estar relacionada com o grau de diferenciação celular, com uma expressão aparentemente elevada em tumores pobremente diferenciados.
4. A expressão elevada de p-Akt está presente nos eventos mais precoces do processo de progressão para o câncer oral.

REFERÊNCIAS¹

Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, Benavides F, Conti CJ, Sauk J, Sausville EA, Molinolo AA, Gutkind JS. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 15;10(12 Pt 1):4029-37.

Ansieau S, Bastid J, Doreau A, et al. Induction of EMT by Twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell.* 2008 Jul;14(1):79-89.

Bellacosa A, Franke TF, Gonzalez-Portal ME, et al. Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications. *Oncogene.* 1993 Mar;8(3):745-54.

Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of Akt kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res.* 2005; 94:29-86.

BioCarta. www.biocarta.com [21 fevereiro 2011].

Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, Hirsch FR, Baron A, Bemis L, Gemmill RM, Drabkin HA, Franklin WA. High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2002 May 15;20(10):2417-28.

Cao Y, Karin M. NF- κ B in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neopl.* 2003 Apr;8(2):215-23.
carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer Res.* 2008 Mar-Apr;28(2B):1355-9.

Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res.* 2007 Mar;67(5):1979-87.

Cheng GZ, Zhang W, Wang L. Regulation of Cancer Cell Survival, Migration, and Invasion by Twist: AKT2 Comes to Interplay. *Cancer Res.* 2008 Feb;68(4):957-60.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Crissman JD, Zarbo RJ. Dysplasia, in situ carcinoma, and progression to invasive squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol*. 1989;13 Suppl 1:5-16.

Cruz IB, Snijders PJ, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, van der Waal I. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oralsquamous cell carcinoma. *J Pathol*. 1998 Apr;184(4):360-8.

Elias MC, Tozer KR, Silber JR. Twist is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia*. 2005 Sep;7(9):824-37.

Fondreville ME, Kantelip B, Reiter RE. The expression of Twist has an impact on survival in human bladder cancer and is influenced by the smoking status. *Urol Oncol*. 2009 May-Jun;27(3):268-76.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Gastroenterol*. 2008 Apr 28;14(16):2487-93.

Guenou H, Kaabeche K, Dufour C, Miraoui H, Marie PJ. Down-regulation of ubiquitin ligase Cbl induced by twist haploinsufficiency in Saethre-Chotzen syndrome results in increased PI3K/Akt signaling and osteoblast proliferation. *Am J Pathol*. 2006 Oct;169(4):1303-11.

Greenblatt MS, Bennet WP, Hollstein HK. Mutations in p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*. 1994 Sep;54(18):4855-78.

Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res*. 2002 Mar 15;62(6):1613-8.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.

Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*. 1993 Oct 28;329(18):1318-2.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004 Sep;18(18):2195-224.
HNSCC. *Histol Histopathol*. 2008 Oct;23(10):1269-78.

Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A, Kluger HM, Berger AJ, Cheng E, Trombetta ES, Wu T, Niinobe M, Yoshikawa K, Hannigan GE, Halaban R. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5270-82.

Hong KO, Kim JH, Hong JS, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, Hong SD. Inhibition of Akt activity induces the mesenchymal-to-epithelial reverting transition with restoring E-cadherin expression in KB and KOSCC-25B oral squamous cell carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009 Feb 26;28:28.

Hotz B, Arndt M, Dullat S. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Aug;13(16):4769-76.

Howe LR, Watanabe O, Leonard J, Brown AM. Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res.* 2003 Apr 15;63(8):1906-13.

INCA (Instituto Nacional do Cancer). Disponível em: www.inca.gov.br [09 março 2008].

Ishida K, Ito S, Wada N, Deguchi H, Hata T, Hosoda M, Nohno T. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer.* 2007 Oct 9;6:62.

Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Li XQ, Ibarra H, Lee JS, Ro JY, El-Naggar A, Hong WK, Hittelman WN. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene.* 1998 Nov 5;17(18):2313-22.

Jeffries S, Eeles R, Goldgar D. The role of genetic factors in predisposition to squamous cell cancer of the head and neck. *Br J Cancer.* 1999; 79:865-7.

Jordan RC, Bradley G, Slingerland J. Reduced levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in epithelial dysplasia and carcinoma of the oral cavity. *Am J Pathol.* 1998 Feb;152(2):585-90.

Kannan S, Tahara H, Yokozaki H, Mathew B, Nalinakumari KR, Nair MK, Tahara E. Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997 Jun;6(6):413-20.

Karim R, Tse G, Putti T. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology*. 2004 Apr;36(2):120-8.

Kukreja P, Abdel-Mageed AB, Mondal D, Liu K, Agrawal KC. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1alpha (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF-kappaB activation. *Cancer Res*. 2005 Nov 1;65(21):9891-8.

Kilpi A, Rich AM, Konttinen YT, Reade PC. Expression of c-erbB-2 protein in keratinocytes of oral mucosal lichen planus and subsequent squamous cell carcinoma. *Eur J Oral Sci*. 1996 Jun;104(3):278-84.

Klingbeil MF, Mathor MB, Giudice FS, Yoshito D, Dos Santos Pinto D Jr. Is it safe to utilize in vitro reconstituted human oral epithelium? An oncogenetic pathway study. *Cell Tissue Bank*. 2010 Aug 21. [Epub ahead of print]

Kovesi G, Szende B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2006 May;35(5):274-7.

Levidou G, Saetta AA, Korkolopoulou P. Clinical significance of nuclear factor (NF)- κ B levels in urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Virchows Arch*. 2008 Mar;452(3):295-304.

Li Q, Zhu GD. Targeting serine/threonine protein kinase B/Akt and cell-cycle checkpoint kinases for treating cancer. *Curr Top Med Chem*. 2002 Sep;2(9):939-71.

Lippman SM, Hong WK. Cancer prevention science and practice. *Cancer Res*. 2002 Sep 15;62(18):5119-25.

Luo GQ, Li JH, Wen JF, Zhou YH, Hu YB, Zhou JH. Effect and mechanism of the Twist gene on invasion and metastasis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol*. 2008 Apr 28;14(16):2487-93.

Mao L, Lee JS, Fan YH, Ro JY, Batsakis JG, Lippman S, Hittelman W, Hong WK. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med*. 1996 Jun;2(6):682-5.

Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2005 Jun;12(6):488-96.

Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis*. 2007 Mar;13(2):126-33.

Moral M, Paramino JM. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. *Histol Histopathol*. 2008 Oct;23(10):1269-78.

Murti PR, Warnakulasuriya KA, Johnson NW, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Mehta FS. p53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential. *J Oral Pathol Med*. 1998 May;27(5):191-6.

Mutirangura A, Supiyaphun P, Triekapan S, Sriuranpong V, Sakuntabhai A, Yenrudi S, Voravud N. Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1996 Aug 1;56(15):3530-3.

Najdi R, Holcombe RF, Waterman ML. Wnt signaling and colon carcinogenesis: Beyond APC. *J Carcinog*. 2011 Mar 17;10:5.

Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2008 Jan;37(1):1-10.

Nylander K, Stenling R, Gustafsson H. p53 expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer*. 1995 Jan ;75(1):87-93.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1483-7.

Oliver RJ, MacDonald DG. G1 cyclins in oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med*. 2001 Feb;30(2):80-6.

Onoue T, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Yoshida H, Sato M. Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2006 Nov;29(5):1133-8.

Ou DL, Chien HF, Chen CL, Lin TC, Lin LI. Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer Res*. 2008 Mar-Apr;28(2B):1355-9.

Papadimitrakopoulou V, Izzo JG, Liu DD, Myers J, Ceron TL, Lewin J, William WN Jr, Atwell A, Lee JJ, Gillenwater A, El-Naggar A, Wu X, Lippman SM, Hittelman WN, Hong WK. Cyclin D1 and cancer development in laryngeal premalignancy patients. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009 Jan;2(1):14-21.

Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, A'Hern R, Lee G, Phillips E, Langdon J. The prognostic significance of allelic imbalance at key chromosomal loci in oral cancer. *Br J Cancer*. 1999 Apr;79(11-12):1821-7.

Pitiyage G, Tilakaratne WM, Tavassoli M, Warnakulasuriya S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol Med*. 2009 Nov;38(10):737-52.

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: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2007.

Pontes HA, de Aquino Xavier FC, da Silva TS, Fonseca FP, Paiva HB, Pontes FS, dos Santos Pinto D Jr. Metallothionein and p-Akt proteins in oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 2009 Sep;38(8):644-50.

Rodrigues-Viciano P, Wame PH, Dhand R. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*. 1994 Aug;370(6490):527-32.

Rosin MP, Cheng X, Poh C, Lam WL, Huang Y, Lovas J, Berean K, Epstein JB, Priddy R, Le ND, Zhang L. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res*. 2000 Feb;6(2):357-62.

Ross JS, Kallakury BVS, Sheehan CE. Expression of Nuclear Factor-kB and IκBα Proteins in Prostatic Adenocarcinomas: Correlation of Nuclear Factor-kB Immunoreactivity with Disease Recurrence. *Clin Cancer Res*. 2004 Apr;10(7):2466-72.

Schussel JL, Pinto Ddos S Jr, Martins MT. Altered β-catenin expression related to cancer progression on actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. *Ann Diagn Pathol*. 2011 Feb;15(1):1-5

Sclabas GM, Uwagawa T, Schmidt C. Nuclear factor kappa B activation is a potential target for preventing pancreatic carcinoma by aspirin. *Cancer*. 2005 Jun;103(12):2485-90.

Shen HM, Tergaonkar V. NF- κ B signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis*. 2009 Apr;14(4):348-63.

Shibata K, Kajiyama H, Ino K. Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. *Annals Oncol*. 2008 Jan;19(1):81-5.

Shibata M, Kodani I, Osaki M, Araki K, Adachi H, Ryoke K, Ito H. Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncol*. 2005 Mar;41(3):304-12.

Shin DM, Lee JS, Lippmann SM. p53 expression: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Apr;88(8):519-29.

Shiota M, Izumi H, Onitsuka T, Miyamoto N. Twist and p53 reciprocally regulate target genes via direct interaction. *Oncogene*. 2008 Sep;27(42):5543-53.

Shiraki M, Odajima T, Ikeda T. Combined expression of p53, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor improves estimation of prognosis in curatively resected oral cancer. *Modern Pathol*. 2005 Nov;18(11):1482-9.

Sidransky D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*. 1995 Aug;11(1):7-9.

Smit MA, Peeper DS. Deregulating EMT and senescence: double impact by a single twist. *Cancer Cell*. 2008 Jul 8;14(1):5-7.

Smith J, Rattay T, McConkey C, Helliwell T, Mehanna H. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. *Oral Oncol*. 2009 Aug;45(8):647-53.

Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R. Alterations of Rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology*. 2005;68(4-6):314-25.

Sosic D, Richardson JA, Yu K, Ornitz DM, Olson EN. Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF- κ B activity. *Cell*. 2003 Jan 24;112(2):169-80.

Srinivasan M, Jewell SD. Evaluation of TGF- α and EGFR expression in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis by quantitative immunohistochemistry. *Oncology*. 2001;61(4):284-92.

Sun XJ, Ma J, Zhang H, Wang XK, Li JH. [The expressions of cyclooxygenase-2 (Cox-2), VEGF in oral squamous cell carcinoma and precancerous lesions and their significances]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2005 Apr;14(2):173-6.

Sun M, Paciga JE, Feldman RI. Phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)/Akt2, activated in breast cancer regulates and is induced by estrogen receptor α via interaction between Eralpha and PI3K. *Cancer Res*. 2001 Aug;61(16):5985-91.

Todd R, Donoff RB, Wong DT. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997 Jun;55(6):613-23.

Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their correspondingsquamous-cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2009 Apr 7;100(7):1128-34.

Urakami S, Shiina H, Enokida H, Hirata H, Kawamoto K, Kawakami T, Kikuno N, Tanaka Y, Majid S, Nakagawa M, Igawa M, Dahiya R. Wnt antagonist family genes as biomarkers for diagnosis, staging, and prognosis of renal cell carcinoma using tumor and serum DNA. *Clin Cancer Res*. 2006 Dec 1;12(23):6989-97.

Wallerand H, Robert G, Pasticier G, Ravaud A, Ballanger P, Reiter RE, Ferrière JM. The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers. *Urol Oncol*. 2010 Sep-Oct;28(5):473-9.

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008 Mar;37(3):127-33.

Watanabe T, Sato K, Kaibuchi K. Cadherin-mediated intercellular adhesion and signaling cascades involving small GTPases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Sep;1(3):a003020.

Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci*. 2008 Mar 15;121(Pt 6):727-35.

Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol*. 2000 Aug;53(4):165-72.

World Health Organization (WHO). Pathology And Genetics of Head and Neck Tumours: World Health Organization Classification of Tumours. 1 ed. Lyon: IARC; 2005

Yang J, Mani SA, Donaher JL. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004 Jun;117(7):927-39.

Yokota J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):497-503.

Yuan ZQ, Sun M, Feldman RI. Frequent activation of Akt2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene*. 2000 May;19(19):2324-30.

Yuen HF, Chua CW, Chan YP. Significance of Twist and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology*. 2007 Apr;50(5):648-58.

Zhang X, Wang Q, Ling MT, Wong YC, Leung SC, Wang X. Anti-apoptotic role of TWIST and its association with Akt pathway in mediating taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2007 May 1;120(9):1891-8.

Zhang Z, Xie D, Li X. Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum Pathol*. 2007 Apr;38(4):598-606.

Zidar N, Gale N, Kojc N, Volavsek M, Cardesa A, Alos L, Høfler H, Blehschmidt K, Becker KF. Cadherin-catenin complex and transcription factor Snail-1 in spindle cell carcinoma of the head and neck. *Virchows Arch*. 2008 Sep;453(3):267-74.

Anexo A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR – 319707
Protocolo 13/2010

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"Análise da expressão imuno-histoquímica das proteínas Twist e Akt em displasias orais e em carcinomas epidermóides orais"**, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Bruno Santos de Freitas Silva, sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) Décio dos Santos Pinto Júnior.

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 protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 18 de agosto de 2010.

Profa. Dra. Marisa Turolia Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP