ANA CAROLINA THOMÉ CAPUANO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PTEN E AKT EM
CÉLULAS DERIVADAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE
BUCAL EM CÂMARA DE INVASÃO**

São Paulo

2005

Ana Carolina Thomé Capuano

**Estudo da expressão das proteínas PTEN e Akt em células
derivadas de carcinoma epidermóide bucal em câmara de
invasão**

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

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto
Júnior

São Paulo

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Capuano ACT. Estudo da expressão das proteínas PTEN e Akt em células derivadas de carcinoma epidermóide bucal em câmara de invasão [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

1)Prof(a) Dr(a):_____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

2)Prof(a) Dr(a):_____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

3)Prof(a) Dr(a):_____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

4)Prof(a) Dr(a):_____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

5)Prof(a) Dr(a):_____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Mais uma vez, à você Piotr. Meu marido, meu amigo, meu grande apoio. E porque tudo fica mais fácil quando estou ao seu lado...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. e orientador **Décio dos Santos Pinto Júnior** pela oportunidade concedida em ser sua orientada e em prosseguir no curso de doutorado em Patologia Bucal. Sua total disponibilidade, amizade e incentivo são suas grandes marcas. Obrigada.

À Profa. Dra. **Vera Cavalcanti de Araújo** não somente pela referência ímpar de profissional e pessoa que representa, mas também por ter sempre palavras e gestos concretos de incentivo, e ao Prof. Dr. **Ney Soares de Araújo** pelos valiosos ensinamentos humanos e profissionais durante o curso. Meu reconhecimento e gratidão.

À Profa. Dra. **Suzana C. O. Machado de Sousa** pela oportunidade em cursar este excelente programa de pós-graduação e pelo exemplo de conduta que representa.

À Prof. Dra. **Andréa Mantesso** pelos conselhos, amizade, inúmeras ajudas e “toques” extras essenciais para o meu crescimento profissional.

Aos Profs. Drs. da Disciplina de Patologia Bucal **Marília T Martins, Fábio Daumas Nunes, Marina H Magalhães e Karen Ortega**, por todo o aprendizado, constante apoio e agradável convivência e companheirismo.

Às Prof. Dras. **Maria da Graça N Homem e Cristina Delboni** pela oportunidade em exercer a docência e a Patologia.

À todos os colegas do curso de pós-graduação, em especial com os quais passei a maior parte do tempo dividindo momentos tanto profissionais quanto pessoais, além dos sucessos e insucessos relativos à tese: **Luciana Matizonkas Antonio, Juliana Kawamura, Fabrício Passador, Filipe Modolo, Arlindo Aburad, Felipe Salles, Katiuchia, Sérgio Alves, Karen Renata, Tatiana Libório, Alexsander Salvoni, Nathalie Rezende e Patrícia Cury.**

Às alunas iniciação científica **Camila e LÍlian**, juntamente com o **Felipe** pela ajuda na elaboração da zimografia. Ao **Sérgio** pela valiosa ajuda no uso do programa de estatística, e ao meu novo “colega de trabalho” **Filipe Modolo** por estar sempre de prontidão para toda e qualquer dúvida.

Às funcionárias da disciplina **Elisa, Edna, Zilda, Néia, Bia, Graça e Patrícia**, por nunca negarem ajuda de qualquer espécie, sempre com simpatia.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro ao projeto (03/00387-0).

E finalmente à minha “tia-dentista” **Vera**, minha inspiração para entrar na área da odontologia e aos meus queridos **pais**, que sempre me ensinaram o valor do estudo e da USP, e provavelmente, por isso por aqui fiquei ao longo desses 10 anos, entre graduação, mestrado e doutorado.

“A ignorância afirma ou nega veementemente; a ciência duvida.”(Voltaire)

Capuano ACT. Estudo da expressão das proteínas PTEN e Akt em células derivadas de carcinoma epidermóide bucal em câmara de invasão [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

RESUMO

PTEN é um gene supressor de tumor, que resulta na proteína citoplasmática de mesmo nome, e possui a capacidade de modular a apoptose e o ciclo celular, assim como de inibir a migração celular. Por outro lado, o oncogene Akt promove a sobrevivência celular e impede a apoptose. A ativação de Akt é inversamente relacionada com a ausência de PTEN em uma variedade de neoplasias malignas. Neste estudo, linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide bucal (HN6, HN30, HN31 e uma linhagem de células controle, HaCat) foram submetidas ao método de invasão *in vitro* e clones celulares altamente invasivos foram isolados. Através das técnicas de imunofluorescência e Western blot foi verificada a expressão de ambas as proteínas nos novos clones (denominados HN6.1, HN30.1, HN31.1 e HaCat.1) e comparada às linhagens controle. A técnica da zimografia também foi realizada, desde que várias metaloproteinases (MMPs) têm demonstrado possuir papel importante no processo de invasão e metástase dos CEB. Nossos resultados revelaram que todas as linhagens celulares e seus respectivos clones invasivos mostraram marcação citoplasmática e nuclear para PTEN e pAkt, respectivamente. A exceção foi a HaCat.1 que apresentou marcação predominantemente citoplasmática para pAkt. A análise do Western blot revelou que os clones invasivos expressam menor quantidade de PTEN, não significantes

estatisticamente. Essa diminuição foi expressiva somente na linhagem HaCat.1 ($p < 0.05$). Em relação ao pAkt, foi observado uma discreta superexpressão dessa proteína nas linhagens invasivas de CEB. Contrariamente, a linhagem HaCat.1 sofreu uma significativa diminuição de pAkt ($p < 0,05$). Finalmente, a zimografia mostrou um discreto aumento de MMP-2 latente e/ou um significativo aumento de MMP-9 ativa em todos os clones invasivos. Nossos resultados sugerem que não há uma relação inversa consistente e significativa entre as proteínas PTEN e Akt no processo de invasão *in vitro* com células derivadas de CEB. Não há somente um padrão de sinalização PTEN-PI3K-Akt no processo de carcinogênese desta neoplasia. A linhagem celular HaCat.1 se comportou diferente das linhagens derivadas de CEB e provavelmente sofreu diferenciação. Um aumento estatisticamente significativo de secreção de MMP-9 ativa foi observado em 2 das 3 linhagens de CEB estudadas.

Palavras-Chave: Carcinoma epidermóide bucal - Câmara de invasão - PTEN - Akt - metaloproteinases – Cultura de células

Capuano ACT. Study of expression of PTEN and Akt protein in OSCC cell lines submitted to *in vitro* assay method [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

ABSTRACT

PTEN is a tumor suppressor gene that encodes a dual phosphates protein capable to modulate apoptosis and cell cycle and prevent cellular migration. On the other hand, Akt oncogene promotes both cell cycle progression and inhibits apoptosis. Akt activation is inversely correlated with PTEN lost in a variety of cancers. In this study, highly invasive clones of OSCC cell lines (HN6, HN30, HN31 and a control cell line, HaCat) were isolated using an *in vitro* assay method. The expression of both proteins in these cells was compared by immunofluorescence and western blot technique. The metalloproteinase activation was analyzed by gelatin zimography, since several MMPs have been shown to play an important role in the invasion and metastasis of OSCC. All OSCC cell lines and its new clones showed cytoplasmatic and nuclear staining for PTEN and pAkt, respectively. The western blot analysis revealed no significant decrease of PTEN expression in the most invasive clones (named HN6.1, HN30.1 and HN31.1). Only HaCat.1 had a significant decrease ($p<0,05$). However, there was no significant increase of Akt in the invasiveness clones and oppositely the expression of Akt was strongly reduced ($p<0,05$) in the HaCat.1. Finally, the zimography showed a discrete increase of inactive MMP-2 and/or a significant

increase of active MMP-9 in all the most invasive cell lines. In conclusion, no correlation was seen between PTEN and pAkt in the process of invasion *in vitro*. There is not only a linear PTEN-PI3K-Akt pathway in OSCC. The HaCat.1 had a different behavior in relation to OSCC cell lines and probably allowed cellular differentiation. In addition, a significant increase of active MMP-9 was seen in 2 of 3 lines of cells derived from OSCC.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma - *in vitro* assay – PTEN – Akt – metalloproteinases – Cell culture

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Atuação de PTEN na célula.....	28
Figura 2.2 – Atuação de Akt na célula.....	33
Figura 5.1 – Imunofluorescência para proteína PTEN.....	50
Figura 5.2 – Imunofluorescência para proteína pAkt.....	51
Figura 5.3 – Análise do Western blot para proteína PTEN, pAkt e β -actina.....	52
Figura 5.4 – Análise da zimografia em gel de gelatina.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

10q23.3	localização do gene no cromossomo 10, braço longo(q), lócus 23.3
APC	APC (<i>Adenomatous Poliposis Coli</i>)
Akt	gene humano homólogo ao oncogene viral v-akt, causador de leucemia em ratos. Sinônimo de PKB.
pAkt	proteína fosforilada Akt
Bcl-1	oncogene promotor de sobrevivência celular - antiapoptótico
CDKs	Quinases dependentes de ciclina (<i>cyclin-dependent kinases</i>)
CEB	Carcinoma Epidermóide Bucal
c-myc	oncoproteína (<i>mammalian transcription factor</i>)
DME	meio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagles Medium)
DNA	ácido desoxiribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
et al.	e outros (<i>et alii</i>)
EGFR	Receptor de Fator de Crescimento Epitelial (Epithelial Growth Factor Receptor)
FAK	Quinase de adesão focal (<i>Focal Adhesion Kinase</i>)
GSK-3	Quinase de síntese de glicogênio 3 (Glycogen synthase kinase 3)
HN6	linhagem celular derivada de Carcinoma Epidermóide de língua
HN6.1	linhagem celular derivada da HN6 que sofreu processo de invasão <i>in vitro</i>
HN30	linhagem celular derivada de Carcinoma Epidermóide de língua

HN30.1	linhagem celular derivada da HN30 que sofreu processo de invasão <i>in vitro</i>
HN31	linhagem celular metastática de Carcinoma Epidermóide de cabeça e pescoço e derivada da linhagem HN30
HN31.1	linhagem celular derivada da HN31 q ue sofreu processo de invasão <i>in vitro</i>
HaCat	linhagem celular derivada de queratinócitos com mutação no gene p53
HaCat.1	linhagem celular derivada da HaCat que sofreu processo de invasão <i>in vitro</i>
Hst-1	oncogene localizado no cromossomo 11q13
ILK	Quinase ligada a integrina (<i>integrin-linked kinase</i>)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	quilodalton
MAP quinase	Proteinoquinase Ativada por Mitógenos (Mitogen-activated Protein Kinase)
mA	miliampères
MDM2	MDM2 (<i>murine double minute type 2 gene</i>)
MEC	Matriz extracelular
mg	miligrama
ml	mililitro
MMPs	metaloproteinases da matriz (<i>matrix metalloproteinases</i>)
MMP-2	metaloproteinase da matriz 2 (<i>matrix metalloproteinase 2</i>)
MMP-9	metaloproteinase da matriz 9 (<i>matrix metalloproteinase 9</i>)
N+	presença de metástase em linfonodo regional
N-	ausência de metástase em linfonodo regional

P21	proteína inibidora do ciclo celular de 21 kDa
P27	proteína inibidora do ciclo celular de 27 kDa
P53	fosfoproteína nuclear de 53 kDa
PBS	Tampão fosfato-salina (<i>Phosphate- buffered saline</i>)
PDK-1	Quinase Dependente de Fosfatinosítídeo 1(<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>)
Ph	potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Quinase (<i>Phosphatidylinositol 3- kinase</i>)
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (<i>Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i>)
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i>)
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PKB	Proteína Quinase B
PRAD-1	oncogene que codifica ciclina D1, uma ciclina envolvida na regulação do ciclo celular
PTEN	Fosfatase homóloga a Tensina (<i>Phosphatase and Tensin Homologue</i>)
Rb	proteína supressora de tumor Retinoblastoma (<i>Retinoblastoma tumor supressor</i>)
Ras	família denominada Ras - identificada em vírus que causam sarcomas em ratos
Rpm	rotação por minuto
SDS	Sulfato dodecil sódico (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
Ser	Serina
Shc	proteína adptadora de receptor (<i>Shc adaptor protein</i>)
T1	Tumor com menos de 2 cm em seu maior diâmetro

T2	Tumor com 2 a 4 cm em seu maior diâmetro
T3	Tumor com mais de 4 cm em seu maior diâmetro
T4	Tumor com mais de 4 cm de diâmetro com envolvimento de estruturas adjacentes
TEMED	tetrametiletilenodiamino

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
CO_2	gás carbônico

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Carcinoma Epidermóide Bucal.....	19
2.2 Invasão e metástase tumoral.....	22
2.3 PTEN.....	25
2.4 Akt.....	30
3 PROPOSIÇÃO.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5 RESULTADOS.....	47
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS.....	73

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide (CE) é a neoplasia maligna que mais acomete a boca, representando 95% de todas as malignidades dessa região (SAPP; EVERSOLE; WYSOCKI, 1997) e a sexta dentre todas as várias neoplasias que afetam o ser humano (PARKIN; PISANI; FERLAY, 1993). Anualmente, são diagnosticados mais de 300.000 novos casos de carcinoma epidermóide bucal (CEB) em todo mundo (BORING; SQUIRES; TONG, 1992; SUBDO; REITH, 2005) e em média 21% desses pacientes apresentam metástase cervical, em razão do atraso no diagnóstico (NEVILLE et al., 2004).

A partir de 1997 alterações genéticas e protéicas foram descobertas de uma proteína chamada PTEN (abreviação de “Phosphatase Tensin Homologue”, ou seja, uma fosfatase homóloga a tensina) em várias neoplasias, como nas de próstata, cérebro (glia), mama, endométrio, pele e rim (LI et al., 1997; STECK et al., 1997). Entretanto, estudos sobre PTEN na carcinogênese dos CEB ainda são escassos e controversos (CHEN et al., 2000; MAVROS et al., 2002; LEE et al., 2001; SQUARIZE; CASTILHO; PINTO JR., 2002). Em nosso laboratório, Squarize et al. em 2002, demonstraram que a expressão imunoistoquímica de PTEN está relacionada com carcinomas epidermóides bucais (CEB) de baixo grau de malignidade, enquanto que a ausência de sua marcação com CEB de alto grau de malignidade.

O principal substrato *in vivo* do PTEN é o fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) presente na membrana celular (LEE et al., 1999). A presença de PTEN mantém os níveis de PIP3 baixos, enquanto que sua ausência promove o aumento da concentração de PIP3 e da sinalização de PI3K/Akt, promovendo a progressão não coordenada do ciclo celular, migração celular e a viabilidade de metástase através da inibição de vários estímulos apoptóticos (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999; DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000).

Várias linhas de pesquisa evidenciam que a ausência de PTEN está envolvida na ativação do proto-oncogene Akt em neoplasias malignas. Sua ativação vai depender da disponibilidade intracelular do PI3K (fosfatidilinositol-3 kinase). Através de sinais extracelulares, esta molécula é recrutada para a membrana plasmática onde fosforila uma outra molécula, PIP2, passando a PIP3. Uma vez na membrana plasmática Akt sofre fosforilações em diferentes sítios por PDK-1 (quinase dependente de fosfatidilinositideo 1) e ILK (quinase ligada a integrina) (NICHOLSON; ANDERSON, 2002; TESTA; BELLACOSA, 2001).

Estudos também sugerem que Akt estimula a produção de metaloproteinases, favorecendo invasão tecidual e metástase (THANT et al, 2000).

Nesse trabalho, através de ensaios de invasão celular, linhagens celulares derivadas de CEB foram dispensadas sobre filtros cobertos por Matrigel, uma membrana basal reconstituída (KLEINMAN et al., 1986). O objetivo deste estudo foi o de avaliar se existe uma possível relação entre PTEN e Akt no processo de invasão *in vitro*, das células derivadas de CEB, através de métodos qualitativos (imunofluorescência) e quantitativos (Western blot). Outro ponto foi verificar o aumento da produção das metaloproteinases por esses clones celulares invasivos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma Epidermóide Bucal

O carcinoma epidermóide (CE) é a neoplasia maligna que mais acomete a boca, representando 95% de todas as neoplasias malignas dessa região (SAPP; EVERSOLE; WYSOCKI, 1997) e a sexta dentre todas as várias neoplasias que afetam o ser humano (PARKIN; PISANI; FERLAY, 1993; NAGLER, 2003). No Brasil, segundo dados do INCA, o CEB representa o 6^o tipo mais comum de câncer dentre os quais acometem homens e o 8^o mais comum nas mulheres (INCA, 2004). O maior acometimento é em pacientes acima dos 40 anos, apresentando maior incidência no decorrer da idade e incidindo mais no sexo masculino do que no feminino (3:1) (SAPP; EVERSOLE; WYSOCKI, 1997; NEVILLE et al., 2004). No entanto, tem-se notado um aumento da incidência em adultos jovens e mulheres (MACFARLANE et al., 1994).

Anualmente, são diagnosticados 300.000 novos casos de carcinoma epidermóide bucal (CEB) em todo mundo (BORIG; SQUIRES; TONG, 1992; SUDBO; REITH, 2005) e em média 21% desses pacientes apresentam metástase cervical, em razão do atraso no diagnóstico (NEVILLE et al., 2004). Os sobreviventes são marcados por disfunções estéticas e funcionais. (SIDRANSKY, 1995; VOKES et al., 1993; SILVERMAN JR, 1988). Estudos revelam que os índices de sobrevida do CEB

são bem menores que os de outras neoplasias como as de mama, cólon, reto, rim e pele (TODD; DONOFF; WONG, 1997).

Os fatores de risco predominantes do CEB são o fumo e o álcool (VOKES et al., 1993). A luz ultravioleta está relacionada ao acometimento do lábio inferior (LIVNEH et al., 1993). Alguns autores afirmam que alguns tipos de vírus podem estar associados ao processo de carcinogênese e que a predisposição genética, raramente mencionada na literatura, apresenta um risco de desenvolver a neoplasia em pacientes com histórias de CEB na família (TODD; DONOFF; WONG, 1997).

Vale ressaltar que os fatores de risco para os CEB e a aparência clínica de lesões pré-malignas são dados prognósticos pobres para avaliar o risco em desenvolver câncer bucal. Logo, marcadores moleculares, que possam ser usados para avaliação do risco de desenvolvimento de CEB, são necessários (PEDRERO et al., 2005).

O tratamento do CEB resume-se na utilização isolada ou associada de três procedimentos, a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. O protocolo de tratamento depende, em linhas gerais, do estágio em que se encontra a neoplasia no momento do diagnóstico. Em se tratando de lesões iniciais, restritas ao local de origem, pode-se optar ou pela cirurgia, ou pela radioterapia, visto que ambas apresentam resultados semelhantes, expressos por um bom prognóstico. Nas demais lesões, quando operáveis, a cirurgia está indicada, associada ou não à radioterapia. Quando existe linfonodomegalia metastática indica-se o esvaziamento cervical do lado afetado, sendo o prognóstico do caso bastante reservado. A quimioterapia é empregada nos casos avançados, visando a redução do tumor, a fim de possibilitar o tratamento posterior pela radioterapia ou cirurgia. O prognóstico nestes casos é extremamente grave, tendo em vista a impossibilidade de se controlar totalmente as lesões extensas

(NEVILLE et al., 2004; INCA, 2004)

Os CEB são caracterizados por um alto grau de invasão local e alta taxa de metástases a linfonodos cervicais, mas baixa taxa de metástases a órgãos distantes (UCHIDA et al., 2001). Além disso, essa neoplasia freqüentemente mostra recorrência local após o tratamento inicial, provavelmente devido à invasão ou metástase das células neoplásicas do tumor primário. Entretanto, o preciso mecanismo molecular de invasão e metástase dos carcinomas epidermóides bucais, principalmente a interação entre células neoplásicas e células hospedeiras ainda são desconhecidas (UCHIDA et al., 2001).

O CEB é uma doença com múltiplas alterações gênicas, que quando somadas, acarretam na desregulação das funções básicas da célula como divisão, diferenciação, senescência e morte, atribuindo à neoplasia suas características (WILLIAMS, 2000; TODD; DONOFF; WONG, 1997; JORDAN; DALEY, 1997). O número de alterações genéticas requeridas para a carcinogênese ainda é incerto. Em geral, a transformação de epitélio normal para carcinoma epidermóide ocorre através de múltiplos passos envolvendo uma ativação seqüencial de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor (FORASTIERE et al., 2001)

Os proto-oncogenes são genes traduzidos em proteínas que participam em todos os níveis da sinalização celular, promovendo o crescimento celular. Normalmente, mutações em proto-oncogenes resultam em ganho de função que levam a estímulos contínuos de crescimento. Os proto-oncogenes mutados passam a serem reconhecidos como oncogenes. Nos CEB vários oncogenes podem estar envolvidos, entre eles, o receptor de fator de crescimento tumoral (EGFR), genes membros da família ras (H-ras, K-ras, N-ras), c-myc, hst-1, PRAD-1, bcl-1 e, mais recentemente, Akt (TODD; DONOFF; WONG, 1997).

Por outro lado, os genes supressores de tumor geralmente proporcionam sinais que restringem a proliferação celular. Estes genes, quando mutados, podem provocar perda de função, aumento de proliferação, perda de coesão, invasão local e metástases (WILLIAMS, 2000; SQUARIZE, 2002). Vários genes supressores de tumor são relacionados junto aos CEB, como por exemplo, p53, Rb, APC, caderina-E, e mais recentemente, PTEN.

2.2 Invasão e Metástase Tumoral

A habilidade de a célula neoplásica migrar e invadir permite sua mudança de posição dentro dos tecidos (KUDO et al., 2004). Exemplificando, esse processo permite que células neoplásicas entrem em vasos sanguíneos ou linfáticos e disseminem para dentro da circulação, e então cresçam em órgãos distantes (KUDO et al., 2004).

O mais importante indicador prognóstico para pacientes com CEB é a metástase para linfonodos cervicais ou para órgãos distantes. O processo de metástase consiste de passos seqüenciais que incluem proliferação, indução de angiogênese, destacamento, motilidade, invasão na circulação, agregação e sobrevivência na circulação, aderência da célula metastática ao novo órgão alvo, extravasamento e colonização de um novo órgão (FIDLER, 1990).

A invasão neoplásica e as metástases são os maiores obstáculos para o sucesso do tratamento das neoplasias malignas. O desenvolvimento de metástases depende da interação entre fatores do hospedeiro e características intrínsecas das células neoplásicas. A lesão metastática representa o ponto final de muitos eventos destrutivos (FIDLER, 1990, UCHIDA et al., 2001). Além disso, neoplasias contêm uma variedade de subpopulações de células com diferente potencial metastático, e clones de alto grau metastático podem existir dentro de um mesmo tumor primário (FIDLER, 1990).

A interação da superfície celular com a matriz extracelular (MEC) tem uma ampla série de conseqüências para uma variedade de processos patobiológicos. Individualmente, os constituintes da MEC participam em vários aspectos do comportamento celular, entre eles, a promoção da motilidade celular (OSSOWSKI, 1996).

Sabe-se que entre os atributos essenciais para a penetração das células neoplásicas na membrana basal estão a motilidade celular ativa, a capacidade de proteólise e a perda da adesão célula-célula (AZNAVOORIAN et al., 1993; KUDO et al., 2004). A proteólise ajuda a formar “canais” para migração celular não impedida, pois há rompimento da membrana basal e degradação da matriz (OSSOWSKI, 1996). Esta membrana basal é composta por uma densa trama de colágeno IV, laminina, entactina e proteoglicana heparan sulfato, normalmente não contém poros que permitem a migração passiva das células neoplásicas. A travessia das células neoplásicas pelas barreiras da membrana basal é o resultado da síntese de proteínas ativas e a aquisição de um fenótipo invasivo (STETLER-STEVENSON; LIOTTA; KLEINER, 1993).

Na transição do carcinoma *in situ* para carcinoma invasivo há o rompimento da

membrana basal pelo crescimento das células epiteliais neoplásicas que possuem elevada capacidade proteolítica. Extratos de neoplasias invasivas têm mostrado conter proteases de serina, cisteína, família do ácido aspártico e uma multiplicidade de metaloproteinases (OSSOWSKI, 1996; IKEBE et al., 1999).

A expressão de membros da família das metaloproteinases (MMPs) em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço tem sido reportada. Há estudos mostrando a expressão das formas latente e ativa das MMP-2 (colagenase tipo IV de 72-kDa e 66-kDa, respectivamente) e MMP-9 (colagenase tipo IV de 92-kDa e 84-kDa, respectivamente) em CE bucais (UCHIDA et al., 2001; VICENTE et al., 2005; PATEL et al., 2005). Entretanto, a correlação da sua expressão com características clínicas e histopatológicas é ainda controverso (VICENTE et al., 2005).

Sendo a membrana basal a primeira barreira para a invasão neoplásica e devido o seu maior constituinte ser o colágeno tipo IV, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) possuem um importante papel na sua degradação, pois são hábeis em degradar este tipo de colágeno, e assim, essenciais no processo de invasão e metástase (IKEBE et al., 1999; UCHIDA et al., 2001)

Uchida et al. (2001), mostraram que células derivadas de CEB produzem grande quantidade de enzimas que degradam MEC e que a atividade da MMP-2 produzida pelas células contribuem para metástase para os linfonodos. Mais tarde, em 1998, esses autores relataram que MMP-2 era ativa em ilhas de células neoplásicas e que poderiam ser marcadores de formação de metástase em pacientes com CEB. Em 2005, Patel et al. vieram corroborar com esses achados, mostrando que MMP-2 encontrava-se elevada nos tecidos de pacientes com metástase de CEB, quando comparados aos tecidos normais adjacentes. Observaram ainda uma maior ativação da MMP-2 em comparação a MMP-9.

Hong et al. (2000), concluíram que a avaliação das MMPs-2 e 9 no CEB pode ser uma ferramenta útil para prever seu prognóstico e recomendar um plano de tratamento apropriado. Kato et al. (2005) em pesquisa com pacientes apresentando carcinoma epidermóide de boca, mostraram uma maior expressão de MMP-2 nos pacientes em estágio T3 e T4 dos que em T1 e T2, e em pacientes N+ comparados aos N-.

Em relação à invasão e metástase, Kudo et al. (2004) sugeriram que o método de isolamento de clones altamente invasivos pode ser proveitoso para este propósito. Eles isolaram clones altamente invasivos de uma linhagem celular derivada de CEB usando o método de invasão *in vitro*, com câmaras de invasão, e perceberam que os clones invasivos mostraram redução da caderina-E e da β -catenina. Eles ainda sugerem que a perda de β -catenina ligada à membrana prejudica a ligação célula/célula, favorecendo metástase.

2.3 PTEN

PTEN (abreviação de 'Phosphatase and Tensin Homologue', ou seja, uma fosfatase homóloga a tensina) é uma fosfatase lipoprotéica com papel significativo no ciclo celular e apoptose, além de aspectos relacionados à fisiologia da célula, incluindo regulação de adesão celular, migração e diferenciação (DI CRISTOFANO; PANDOLFI,

2000). A função de supressor de tumor do PTEN é dependente somente da sua atividade de fosfatase lipídica (MYERS et al., 1998).

O gene supressor de tumor PTEN, também conhecido como MMAC1 ("Mutated in Multiple Advanced Cancers") está localizado no cromossomo 10q23. A partir de 1997 foram descobertas alterações genéticas e protéicas de PTEN em várias neoplasias, como na de próstata, cérebro (glia), mama, endométrio, pele e rim (LI et al., 1997; STECK et al., 1997, DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000).

Entretanto, a sua participação na carcinogênese dos CEB é controversa e poucos estudos foram feitos. Mavros et al. (2002) concluíram, após um estudo com cinquenta espécimes de tumor primário de CEB, que alterações do gene PTEN não são significativas na formação dessa neoplasia. Ao contrário, Lee et al. (2001) relataram que enquanto as alterações genéticas de PTEN são raras nos CE de cabeça e pescoço, a perda da expressão de PTEN não é um evento incomum nos CE de língua sendo, portanto, um bom marcador de prognóstico. Nessa mesma linha de pesquisa, Squarize et al. (2002), demonstraram que a expressão imunoistoquímica de PTEN está relacionada com carcinomas epidermóides bucais (CEB) de baixo grau de malignidade, enquanto que a ausência de sua marcação está relacionada com CEB de alto grau de malignidade. Isso porque o PTEN é um gene supressor de tumor, que resulta na proteína citoplasmática de mesmo nome e possui a capacidade de modular a apoptose e o ciclo celular, assim como de inibir a adesão e a migração celular (LI et al., 1997).

PTEN é composto de um domínio fosfatase N-terminal, um domínio C2 e uma região caudal C-terminal que contém múltiplos sítios de fosforilação (DAS; DIXON; CHO, 2003). PTEN contém um domínio fosfatase tirosina protéica com características que se assemelham as fosfatases de especificidade dual, que são capazes de

defosforilar tanto os resíduos serina e treonina, quanto os de tirosina. Apesar de PTEN possuir a especificidade dual, seu principal substrato *in vivo* é o fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) presente na membrana celular (LEE et al., 1999, DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000). A presença de PTEN mantém os níveis de PIP3 baixos, enquanto que sua ausência promove o aumento da concentração de PIP3 e da sinalização de PI3K/Akt, promovendo a progressão não coordenada do ciclo celular, migração celular e a viabilidade de metástase através da inibição de vários estímulos apoptóticos (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999; DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000).

Assim, a ativação de PI3-Kinase por sinalizações dependentes de MEC ou fatores de crescimento, leva a síntese de PIP3, que é defosforilado por PTEN a PIP-2 (fosfatidilinositol (4,5)-difosfato). Akt liga-se a PIP-3 permitindo sua fosforilação e ativação. Na ausência de PTEN, ativa-se Akt fosforilado e se inativa membros da família Forkhead de fatores de transcrição (FKHR), as proteínas pró-apoptóticas Bad e caspase-9, e bloqueia citocromo C liberado e apoptose dependente de Faz, através de caminhos ainda desconhecidos. O Akt ativado também regula negativamente níveis de p27 e inativa GSK-3, resultando na estabilização da ciclina D1, levando ao aumento da proliferação celular. PTEN também pode interagir com FAK defosforilado e Shc, deste modo, inibindo a expansão e motilidade celular através da regulação negativa de sinais de adesão focal e MAP quinase (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999).

A Figura 2.1 mostra como PTEN atua na proliferação, migração, apoptose e sobrevivência celular. Os fatores de crescimento e sinais de sobrevivência ativam os receptores de membrana, os quais recrutam PI3K para junto da membrana, que fosforila o lipídio PIP2 produzindo o mensageiro lipídico secundário PIP3. Assim, os fosfolipídios PIP2 e PIP3, normalmente ausentes em células quiescentes, aparecem

em segundos quando estimulados os receptores da membrana com fatores de crescimento e sobrevivência tais como os derivados de plaquetas (PDGF), neural (NGF), epitelial (EGF), de fibroblasto (FGF), de insulina (IGF), interleucina (IL), matriz extracelular e E-caderinas (LI et al., 1997; HOPKIN, 1998; MAEHAMA; DIXON, 1999; PACE et al., 1999).

Figura 2.1 – Atuação de PTEN na célula

Fonte: www.biocarta.com

Há estudos indicando que o PTEN é expresso em níveis normais em linhagens celulares neoplásicas (WENG et al., 1999, SNADON et al., 2001), embora haja outros

estudos relatando sua superexpressão em várias linhagens celulares, e assim aumentando a suscetibilidade a apoptose e 'anoikis' (LU et al., 1999). A ausência de PTEN é fortemente relacionada com a ativação da AKT em linhagens celulares neoplásicas de origem linfóide (DAHIA et al., 1999).

Embora se acredite que o PTEN age negativamente regulando a ativação da Akt através da defosforilação de PIP3, recentes estudos indicam adicionais mecanismos. PTEN expressa atividade proteína fosfatase contra inúmeros substratos e recentemente foi mostrado a defosforilação de ILK (MORIMOTO et al., 2000) que, por sua vez, está implicado no mecanismo de ativação da Akt. PTEN também inibe a fosforilação de Shc induzido por fatores de crescimento, promove a supressão do padrão de sinalização MAP quinase, além de defosforilar FAK. PTEN inibe p130CAS através da FAK, resultando na inibição da migração celular (Figura 2.1).

Segundo Gu et al. (1998), PTEN é um forte inibidor da MAP quinase em células derivadas de glioblastoma (U-87MG, DBTRG-05MG e U-373MG). Essa intervenção provavelmente se dá através do ras, já que a ativação do EGFR não parece requerer a ação de PI3K, fazendo com que seja pouco provável que também haja defosforilação do Akt quando há estímulo por EGF. Estes autores também sugerem ação-chave do PTEN em defosforilação do complexo Shc/ GRb2 e da FAK, o que leva à inativação do ras, sem afetar a via de sinalização do Akt. Quando há ativação do ras, um dos genes alvos é a ciclina D1.

A superexpressão de PTEN em uma variedade de linhagens de células neoplásicas permitiu melhor definição do seu papel no controle do ciclo celular e supressão tumoral. Inicialmente, através indução da parada de G1, PTEN exerce seu papel de supressor tumoral (DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000).

Segundo Squarize (2002), a marcação imunoistoquímica do PTEN varia ou em forma de rede por todo o citoplasma ou de maneira intensa próxima à membrana celular. Este tipo de marcação pode estar relacionado ao fato do PTEN conter seqüências com significativa homologia com a tensina, proteína presente no citoesqueleto (LI et al., 1997; STECK et al., 1997). Frequentemente a marcação se intensificava próximo à membrana celular, o que seria esperado, já que os substratos (PIP3 e FAK) do PTEN pertencem ou são deslocados para próximo da membrana celular quando a célula recebe estímulos extracelulares (SQUARIZE, 2002). Assim, o PTEN muitas vezes é encontrado junto à membrana celular (LEE et al., 1999). Há autores que afirmam que a presença junto à membrana celular é de extrema importância, pois assim atua no início da cascata de sinalização celular e não somente no final dela, como é o caso de proteínas atuantes no núcleo da célula (SQUARIZE, 2002; DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000; LI et al., 1997).

2.4 Akt

O estudo da família de proteínas Akt iniciou-se quando dois genes, Akt1 e 2, foram identificados como homólogos humanos do oncogene viral v-Akt, responsável por leucemia em ratos (STAAL, 1987). Por ter similaridades com as proteínas kinases A (PKA) e C (PKC), é conhecida como proteína kinase B/Akt (PKB/Akt) e os membros da família chamados PKB α (Akt1), PKB β (Akt2) e PKB γ (Akt3) (BELLACOSA et al,

1991; COFFER; WOODJET, 1992; JONES et al, 1991; NICHOLSON; ANDERSON, 2002).

Essa molécula é ativada em células expostas a vários estímulos como hormônios, fatores de crescimentos e componentes da matriz extracelular (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Recentemente se verificou que Akt é freqüentemente ativa em muitas neoplasias malignas humanas. Sua ativação pode ocorrer tanto pela amplificação do gene ou como resultado de mutações em componentes que sinalizam sua ativação (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Acredita-se que Akt promova a proliferação não coordenada e o aumento de sobrevivência celular, e assim agindo na progressão do câncer (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). A ausência de PTEN é fortemente relacionada com a ativação de Akt em linhagens de células neoplásicas (DAHIA et al., 1999). Para Dahia et al. (1999), os níveis de PTEN e Akt fosforilados são inversamente correlacionados.

O estudo pioneiro sobre a participação do Akt em neoplasias (STAAL, 1987) não detectou mutações ou alterações genéticas, mas sim sua superexpressão. Em várias neoplasias analisadas, foram encontradas superexpressões das diferentes formas do Akt (THOMPSON et al., 1996; NAKATANI et al., 1999), mas os estudos em material clínico ainda são escassos, quanto aos níveis expressos e sua ativação (NICHOLSON; ANDERSON, 2002).

O Akt possui domínios distintos, nos quais estão localizados os sítios de ligação que vão promover sua ativação. Os três possuem um domínio PH idêntico, seguido por domínios catalíticos que são semelhantes (FERGUSON et al., 2000; LIETZKE et al., 2000) aos das proteínas PKA e PKC (ANDJELKOVIC et al., 1995; JONES et al., 1991). A ativação do Akt vai depender da disponibilidade intracelular de PI3-K (fosfatidilinositol-3 quinase). Através de sinais extracelulares, esta molécula é recrutada

para a membrana plasmática onde fosforila uma outra molécula, PIP2, passando a PIP3. Esta é responsável pelo recrutamento do Akt sendo regulada negativamente pelo PTEN (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Uma vez na membrana plasmática, Akt sofre fosforilações em diferentes sítios, por PDK-1 (Fosfatidilinositol kinase-dependente 1), PDK-2 (fosfatidilinositol kinase-dependente 2), e principalmente ILK (Kinase ligada a integrina) (NICHOLSON; ANDERSON, 2002; TESTA; BELLACOSA, 2001). Estudos recentes têm apontado que esta ativação necessita de fosforilação do Akt em sítios conhecidos como Thr308 (treonina 308) e Ser473 (serina 473) (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Por outro lado, Akt pode sofrer ação de fosfatases, e assim ter sua expressão estimulada ou reprimida.

Após sua ativação na membrana plasmática, Akt passa a ter localização citoplasmática e nuclear (ANDJELKOVIC et al., 1995; BORGATTI et al., 2000; DUFNER et al., 1999; FILIPA et al., 2000; MEIER et al., 1997). Muitos substratos do PKB/Akt são proteínas que funcionam no núcleo e através do estudo de algumas delas pôde se chegar à conclusão que Akt regula vários processos celulares incluindo a apoptose, proliferação e sobrevivência celular, diferenciação, metabolismo e angiogênese (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Akt regula positivamente fatores anti-apoptóticos e negativamente fatores pró-apoptóticos (Figura 2.2). Como exemplos, Akt promove inativação de membros da família de proteínas *forkhead* (FKHR), impedindo que haja transcrição dos genes pró-apoptóticos *Bim* e *Fas-L* (DATTA; BRUNET; GRENNBERG, 1999). De maneira oposta, também promove a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que induz os genes c-IAP-1 e c-IAP-2, que promovem sobrevivência celular.

Akt também pode fosforilar diretamente proteínas pró-apoptóticas ao invés de atuar diretamente na transcrição gênica. É o caso das proteínas *Bax* e *Bad*, reconhecidamente apoptóticas (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Ao fosforilar *Bad*,

em um sítio específico, esta última é seqüestrada no citoplasma por uma proteína que a impede de exercer seu efeito pró-apoptótico (DATTA et al., 1997). A proteína Bax sofre uma ação do Akt através do qual o impede de se ligar à membrana mitocondrial. Outra faceta da ação anti-apoptótica do Akt, se revela ao agir sobre as proteínas caspase-3 e caspase-9 (ZHOU et al., 2000).

Figura 2.2 – Atuação do Akt na célula

fonte: www.biocarta.com

Com relação à proliferação celular, Akt possui amplo espectro de ação ao promover ou impedir a ação de diversas proteínas relacionadas ao ciclo celular. Entre as proteínas envolvidas na proliferação celular relacionada aos mecanismos de ação do Akt podemos citar p21, p27, ciclina D1, mdm2 e p53 (ASSOIAN; SCHWARTZ, 2001; NICHOLSON; ANDERSON 2002; TESTA; BELLACOSA 2001; ZHOU et al,

2001). Em um estudo preliminar, conduzido por Cheng et al (1997), foi observado que na superexpressão de Akt2, havia progressão e aceleração do ciclo celular, e possivelmente Akt tem papel na progressão entre as fases G1-S. Esta progressão é controlada pela proteína pRB (retinoblastoma), que suprime a transcrição dos genes responsáveis por esta passagem. As proteínas CDKs (ciclinas kinase-dependentes) podem fosforilar pRB e promover a progressão do ciclo celular. A função das CDKs é regulada por uma família de proteínas inibitórias, dentre as quais se destacam p21 e p27 (ASSOIAN; SCHWARTZ, 2001). Em células estimuladas à proliferação, p21 e p27 passam do núcleo para o citoplasma, onde são fosforiladas pelo Akt (TESTA; BELLACOSA, 2001; ZHOU et al, 2001). Por consequência, o ciclo celular deixará de sofrer o controle promovido por estas proteínas.

A ciclina D1 (CD1), outra importante molécula envolvida na proliferação celular, também está sujeita à ação do Akt. A superexpressão da ciclina D1 tem sido encontrada em muitas neoplasias, particularmente no câncer de mama, e evidências vêm apontando um papel do Akt em todos os níveis em que a CD1 pode atuar, seja na transcrição gênica, translação do mRNA ou estabilidade protéica (NICHOLSON; ANDERSON, 2002).

Outras duas importantes proteínas que têm suas ações sujeitas a fosforilação do Akt são mdm2 e p53 (MAYO; DONNER, 2001). Um dos mais conhecidos e estudados genes relacionados a apoptose e carcinogênese, o p53, promove a parada do ciclo celular, podendo levar a célula à morte. Mayo e Donner (2001), mostraram que em células de cultura estimuladas à proliferação, mdm2 sofre fosforilação pelo Akt no citoplasma, e passa para o núcleo, agindo sobre p53, impedindo sua ativação. Isso ocorre porque o complexo mdm2/p53 é transportado para o citoplasma, local em que o p53 vai ser degradado.

Estudos sugerem que Akt estimula a produção de metaloproteinasas, favorecendo invasão tecidual e metástase (THANT et al., 2000). Em especial, a metaloproteinase 9 é apontada como enzima altamente participativa no processo invasivo destas células. O rompimento do complexo formado pela caderina-E em queratinócitos pré-malignos favoreceu a digestão enzimática de matrigel em cultura, com aumento da metaloproteinase 9. Este mesmo estudo mostrou ainda que quando a junção mediada pela Caderina-E encontra-se estabilizada, esta recruta PI3K, que atua na maturação e estabilização das ligações inter e intra-celulares (MUNSHI et al., 2002). Por fim, o estudo ainda mostrou que quando há aumento da oferta intracelular de PI3K, a via do Akt encontra-se ativada e proporciona aumento da produção de proteinases.

Vale salientar que Akt e sua via relacionada (PI3K/Akt/PTEN) vêm se configurando como candidatos a tratamentos quimioterápicos, devido a forte relação que parece apresentar com algumas neoplasias. Há estudos indicando que a inativação da via PI3K/Akt é de extrema importância em diferentes neoplasias para que a resistência à quimioterapia e radioterapia seja vencida (VARA et al., 2004). Como exemplo, em linhagens celulares de câncer de pâncreas a sinalização PI3K/Akt tem sido implicado na resistência a drogas quimioterápicas, e o potencial benefício terapêutico dos inibidores de PI3K combinados com gencitabina para tratamento de câncer de pâncreas, foi descrito (NG et al., 2000). Vara et al. (2004) revisaram uma série de drogas que têm potencial anti-neoplásico, e agem sobre a via do PI3K/Akt. Como exemplo ele cita o transtuzumab (Herceptina), desenvolvido pela Genetech e que vem mostrando bons resultados em relação a sobrevida de pacientes com carcinomas de mama. Seu mecanismo de ação se dá pela ativação de PTEN e a conseqüente inativação da via de sinalizada por PI3K (NAGATA et al., 2004). Ao ligar-se ao receptor ErbB2, transtuzumab suprime a ação da molécula src sobre PTEN, que fica desfosforilado e impede que PI3K dê início à via sinalizatória que culminará na

ativação de Akt. Finalizando, Brown, O'Prey e Harrison (2003) verificaram a efetividade de um flavanóide (morin) sobre a proliferação em culturas de carcinoma epidermóide, e observaram uma redução na atividade proliferativa e um decréscimo na expressão do pAkt, sendo o mais interessante que esse decréscimo foi muito mais marcante em células de carcinoma que em células da mucosa oral normal.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como proposta:

1. Identificar possíveis modificações qualitativas e quantitativas das proteínas PTEN e Akt nos clones invasivos (HN6.1, HN30.1, HN31.1 e HaCat.1) em relação às suas linhagens celulares originais (HN6, HN30, HN31 e HaCat).
2. Avaliar a existência de relação entre PTEN e Akt no processo de invasão *in vitro* nas células derivadas de CEB.
3. Adicionalmente, verificar e analisar o aumento da secreção de metaloproteinases pelos clones invasivos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo Celular

Foram utilizadas para esta pesquisa quatro linhagens celulares, sendo duas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide bucal de língua humano (HN6 e HN30), uma linhagem metastática (HN31) e uma linhagem controle de células epiteliais com mutação no gene p53 (HaCat). Vale ressaltar que essas linhagens celulares foram desenvolvidas e cedidas pelo National Institutes of Health (NIH, USA), além de serem linhagens já estabelecidas (PATEL et al., 2000).

As quatro linhagens foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME-Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma). As células foram mantidas em frascos a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂. Toda a manipulação ocorreu em capela de fluxo-laminar. O crescimento das células foi monitorizado diariamente em microscópio invertido de contraste fase, e o meio de cultura trocado de acordo com o metabolismo celular. Após atingirem a sub-confluência, as células foram sub-cultivadas. Amostras representativas da cultura foram posteriormente congeladas e mantidas em recipientes contendo nitrogênio líquido, crio-protegidas com 5-10% de di-metil sulfóxido (DMSO-Sigma).

4.2 Ensaio de invasão celular

Para realização dos ensaios de invasão foram utilizados câmaras bipartite Transwell (8 μ m de diâmetro – Costar Corp., Cambridge, MA) (UCHIDA et al., 2001; KUDO et al., 2004). Essas câmaras são compostas por dois compartimentos distintos, separados entre si por um filtro de polycarbonato, com poros de 8 μ m de diâmetro. Esse sistema cria dois ambientes diferentes que permitem a passagem voluntária das células de um lado para o outro do filtro, já que o diâmetro dos poros é consideravelmente menor que o diâmetro das células.

Os filtros Transwell foram cobertos com uma fina camada de Matrigel, uma membrana basal reconstituída composta por laminina, colágeno IV, entactina e nidogênio (KLEINMAN et al., 1986). A concentração final de Matrigel foi de 1 μ g/ μ l em DME sem soro. Para isso, a solução estoque de Matrigel (13 mg/ml) foi descongelada “overnight” no refrigerador, à temperatura de 4 °C, para evitar sua geleificação prematura. Em seguida, essa solução estoque foi diluída em DME sem soro (Sigma) na proporção de 1:1 e então 30 μ l foram dispostos sobre cada filtro, de modo a formar uma fina camada. Toda a manipulação do Matrigel foi realizada a 4°C. As pipetas utilizadas em sua preparação, bem como a porção superior das câmaras bipartite “Transwell” foram previamente resfriadas a 4°C. As câmaras contendo os filtros foram então colocadas na estufa a 37°C por 4 horas para total geleificação do Matrigel.

Usando tripsina (Sigma), as células HN6, HN30, HN31 e HaCat foram destacadas dos frascos de cultura e dispensadas na câmara superior do Transwell.

Foi acrescentado meio DME tanto no compartimento superior, quanto no inferior da câmara. Após cinco dias, as células com maior capacidade de invasão atravessaram o Matrigel e ficaram na câmara inferior do Transwell. Essas células selecionadas, do compartimento inferior, foram então retiradas da câmara (com tripsina) e cultivadas em placas de Petri por mais quatro passagens. Essas células tratadas, ou clones invasivos, foram denominadas HN6.1, HN30.1, HN31.1 e HaCat.1.

4.3 Imunofluorescência

As células tratadas e os controles foram submetidos a imunofluorescência para a detecção das proteínas PTEN e Akt. Células plaqueadas em lamínulas de vidro foram fixadas em metanol absoluto a -20°C por 6 minutos, lavadas em PBS e então incubadas em BSA 1% por 60 minutos. Foram utilizados anticorpos primários gerados em camundongo para PTEN (Sigma) e coelho para pAkt 1/2/3 (Ser^{472/473/474}, Sigma) e com concentrações conforme recomendação do fabricante, 1:50 μl .

Como anticorpo secundário utilizamos anticorpos anti-camundongo e anti-coelho conjugado com isotiocinato de fluoresceína (Amersham Co., Arlington Heights, IL, USA) na concentração final de 1:100 μl . Todos os procedimentos foram precedidos de lavagens em PBS e todas as incubações foram feitas por 1 hora à temperatura ambiente. A montagem das lamínulas sobre lâminas de vidro foi feita utilizando-se meio de montagem (Vectashild, Vector Lab, CA, USA). Como controle negativo, amostras foram tratadas como descrito acima, porém com adsorção com o peptídeo

do anticorpo primário (Sigma). As observações e fotomicrografias foram realizadas em epi-iluminação, em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.4 Western Blot

Foi realizada a extração das proteínas das células cultivadas segundo os grupos experimentais (tratados e controles) já descritos anteriormente.

Após remover o meio de cultura, as placas contendo as células foram colocadas sobre gelo, lavadas 3 vezes com PBS à frio e adicionados 0,2 ml de tampão RIPA (10^{-2} mol/L Tris-Cl pH 7,5; 1% de desoxicolato de sódio; 1% de Triton X-100; $1,5 \times 10^{-1}$ mol/L NaCl, 0,1% de SDS; inibidores de proteases: 1% aprotinina, 10^{-3} mol/L PMSF, 1% de leupeptina), por 10 minutos e posteriormente raspados. Estes lisados foram centrifugados por 10 minutos a 15.000 rpm a 4°C para descartar os precipitados e manter os sobrenadantes. Estes sobrenadantes de proteínas foram estocados a -80°C.

Foi tomada uma amostra, de cada grupo celular, da porção clarificada (sobrenadante) e realizado a quantificação através do método do ácido biocinconinico (BCA Protein Assay Reagent Kit – Pierce). Esse método tem por princípio a reação de peptídios das amostras com o cobre (Cu^{2+}) 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, 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.

Obtida a quantificação das amostras, foi utilizado a mesma quantidade de proteínas totais nos grupos estudados, para posteriormente ocorrer a análise da porcentagem em que cada proteína de interesse se apresenta dentro dessas proteínas totais. As alíquotas previamente quantificadas foram fervidas com tampão de amostra para a denaturação das proteínas (sample buffer), contendo 3% de dodecil sulfato e sódio (SDS), 150mM Tris pH 6.8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0.01% de azul de bromofenol.

Em seguida foram aplicadas 20 µg de proteína por canaleta, que foram empilhadas em gel de empilhamento (preparado com 0.15M Tris, 40% bis-acrilamida, 10% SDS, 20% de persulfato de amônia e TEMED), separadas em gel de poliacrilamida a 10 % (preparado com 0.61M Tris, 10% SDS, 40% bis-acrilamida, 20% de persulfato de amônia e TEMED) e realizada a eletroforese a 100V durante 3 horas. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope (Bio Rad, Hercules, Califórnia, USA).

Transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose:

A transferência das proteínas que migraram (do gel) para a membrana de nitrocelulose (Hybond-P, Amersham) foi realizada com a técnica do eletrotransferência úmida com um aparelho apropriado (Hoefer, miniVE, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, utilizando uma corrente de 35 mA durante 2 horas e meia. Após a transferência, a membrana era submetida à fase de bloqueio ou lavada e seca para posterior reação.

Eventualmente a membrana foi corada com 0,1% Ponceau em 10% ácido acético por alguns minutos e descorada rapidamente em TBST (Tris 5×10^{-2} mol/L, pH 7,4, $1,5 \times 10^{-1}$ mol/L de NaCl, 0,1% Tween 20).

Imunorreação:

Para o anticorpo PTEN, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em pó desnatado em TBST por 2 horas a temperatura ambiente e sob agitação. No caso do anticorpo pAkt, o bloqueio foi feito com BSA 1% em TBST, devido à interferência que proteínas do leite podem exercer em sítios de ligação para proteínas fosforiladas. Em seguida, a solução de bloqueio era removida e colocada a solução contendo o anti-soro de interesse (PTEN ou pAkt 1/2/3) diluído em solução de TBST. Incuba-se por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. Seguiram três lavagens de 10 minutos para remoção do anticorpo não-absorvido com TBST, sob agitação e à temperatura ambiente. O anticorpo secundário (conjugado com peroxidase) foi então aplicado por 1 hora e depois lavado em TBST 2X por cinco minutos cada.

A revelação da reação foi pelo método colorimétrico, utilizando o Kit Opti-4CN Substrate da Bio-Rad. Esta reação produz uma coloração enegrecida nas bandas positivas para o anticorpo primário de interesse. Assim, uma parte deste diluente concentrado Opti-4CN foi adicionada a nove partes de água deionizada. Foram utilizados 0,25ml para cada cm^2 da membrana. Para cada 10ml do diluente preparado adicionava-se 0,2ml de substrato Opti-4CN, misturando-se e colocando sobre a membrana. O processo de revelação ocorria em até 30 minutos. Posteriormente, a membrana era lavada e estava pronta para documentação.

Como controle, foi utilizado anticorpo gerado em camundongo β -actina (Sigma).

Forma de análise dos resultados

A) Análise densitométrica

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

B) Análise estatística

Os valores obtidos da análise densitométrica foram avaliados através do programa BioEstat 3.0. Os valores em triplicata foram analisados estatisticamente através do método ANOVA um critério.

4.5 Zimografia

O meio condicionado obtido das amostras tratadas e controles foi colocado em solução contendo inibidores de protease (1mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF e 1mg/ml E-64). Em seguida foi centrifugado a 6000g por 10 min a 4°C. Seguiu-se quantificação de proteína através do método de Bradford. O meio foi então colocado em tampão de amostra (sample buffer), contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 60mM Tris pH 6.8, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol.

As amostras (20µg) foram carregadas em gel de 10% de poliacrilamida contendo 0,2% de gelatina. Após a eletroforese, o gel foi lavado em 10mM de Tris (pH 8) incluindo 2,5% de Triton X-100, para a remoção do SDS e renaturação das proteínas. Em seguida, foi incubado por 15 minutos em solução tampão revelador do gel (50mM de tris, pH 8.8, 5mM CaCl₂, 0.02% NaN₃) e Triton X-100 (2 a 3ml) em temperatura ambiente e posteriormente por 20 horas à 37°C na mesma solução. Depois de corar com Coomassie Brilliant Blue R-250 *overnight* e descorada com 40% de metanol e 10% de ácido acético glacial em água destilada, as metaloproteinases ativas foram identificadas como bandas claras de lise em fundo azul.

Para comprovar que as bandas obtidas são realmente as MMP-2 e MMP-9, um dos géis foi mantido no tampão de incubação com 15mM de EDTA. Esse quelante inibe especificamente as MMPs provocando bandas menos intensas no gel de gelatina.

As áreas das bandas de degradação enzimática obtidas também foram comparadas, utilizando-se o programa de domínio público Image J.

5 RESULTADOS

Imunofluorescência

A imunofluorescência mostrou que tanto as linhagens celulares controle como as amostras tratadas expressaram as proteínas PTEN e Akt.

A marcação da proteína PTEN revelou-se ser sempre citoplasmática. Porém, algumas variações nesta marcação foram notadas (Figura 5.1) ora, com aspecto vesicular, ora em rede ou até de maneira linear intensa próxima à membrana celular. Por outro lado, a marcação do pAkt mostrou-se ser nuclear, com exceção da linhagem HaCat.1, que adquiriu marcação predominantemente citoplasmática, com eventuais áreas de marcação nuclear (Figura 5.2)

Imunofluorescência para PTEN (Figura 5.1):

HN6.1 – marcação citoplasmática que se intensifica próximo à membrana celular	HN6 - marcação citoplasmática em forma de rede
HN30.1 - marcação citoplasmática que se intensifica próximo à membrana celular	HN30 - marcação citoplasmática que se intensifica próximo à membrana celular
HN31.1 – marcação citoplasmática em forma de vesículas	HN31– marcação citoplasmática em forma de vesículas
HaCat.1 – marcação citoplasmática em forma de	HaCat – marcação citoplasmática em forma

vesículas	de vesículas
-----------	--------------

Imunofluorescência para Akt (Figura 5.2):

HN6.1 – intensa marcação pontual nuclear	HN6 - intensa marcação pontual nuclear
HN30.1 - intensa marcação pontual nuclear	HN30 - intensa marcação pontual nuclear
HN31.1 – intensa marcação pontual nuclear	HN31– intensa marcação pontual nuclear
HaCat.1 – marcação predominantemente citoplasmática em forma de rede	HaCat – intensa marcação pontual nuclear

Western Blot

Através da análise das bandas do Western blot, pode-se notar que a quantidade de PTEN praticamente se manteve igual na HN6.1 em comparação a HN6, enquanto que as células tratadas HN30.1, HN31.1 e HaCat.1 sofreram diminuição não significativa na quantidade da expressão dessa proteína, sendo que a diminuição mais expressiva ($p < 0,05$) ocorreu na linhagem HaCat.1 (Figura 5.3A). Todas as linhagens foram comparadas com suas respectivas linhagens controle não invasiva.

Em relação à expressão da proteína Akt (Figura 5.3B), houve um aumento não significativo ($p > 0,05$) dessa proteína fosforilada nas linhagens de CEB mais invasivas (HN6.1, HN30.1 e HN31.1), exceto na linhagem HaCat.1, que mostrou a expressão dessa proteína diminuída de maneira significativa ($p < 0,05$). Foi notado que a pAkt encontra-se em menor quantidade nas linhagens HN31, HN31.1 e HaCat.1.

O controle da proteína β -actina, proteína constitutivamente ativa, confirmou a correta quantificação protéica entre as amostras (Figura 5.3C).

Secreção de metaloproteinases

Devido a indagações adicionais, foram realizados experimentos com as amostras tratadas e controles para observar o possível aumento de produção de metaloproteinases, através da técnica da zimografia (Figura 5.4).

Os resultados revelaram que nas células tratadas, a presença de metaloproteinase 2 latente (72 kDa) foi aumentada em relação às respectivas amostras controle, com exceção da HN6.1 que teve a secreção diminuída. Porém, análise foi estatisticamente significativa apenas na linhagem HN6.1 em relação a HN6.

Entretanto, a zimografia revelou aumento da metaloproteinase 9 ativa (84 kDa) nas células HN6.1 e HN31.1 em relação as suas respectivas linhagens controle. Houve diminuição da secreção na HN30.1. Aparentemente não há expressão de metaloproteinase 9 nas células HaCat e HaCat.1. Esses valores foram estatisticamente significantes para as linhagens que sofreram aumento da secreção, HN6.1 e HN31.1 ($p < 0,05$).

Figura 5.1 - Imunofluorescência para PTEN. Marcação citoplasmática tanto nas linhagens tratadas quanto nas controle. Aumentos: HN31, HN31.1, HaCat e HaCat.1, 400X; HN6, HN6.1, HN30, HN30.1, 630X

Figura 5.2 - Imunofluorescência para pAkt. Marcação nuclear tanto nas linhagens tratadas, quanto nas linhagens controle, com exceção da linhagem HaCat.1, que apresentou marcação predominantemente citoplasmática. Aumentos: 630X

Figura 5.3 -Análise do Western blot. A) Western blot para PTEN mostrando diminuição dessa proteína em todas as linhagens tratadas, porém estatisticamente significativa apenas na linhagem HaCat.1. B) Western blot para pAkt mostrando discreto aumento dessa proteína nas linhagens de CEB tratadas, exceto a HaCat.1 que mostrou diminuição estatisticamente significativa. Observa-se menor quantidade de pAkt nas linhagens HN31, HN31.1 e HaCat.1. C) Western blot para β -actina (controle)

Figura 5.4 - Análise da zimografia. Observa-se aumento da secreção de MMP-2 latente nas linhagens HN30.1, HN31.1 e HaCat.1, e aumento de MMP-9 ativa nas linhagens HN31.1 e HN6.1. Somente a secreção de MMP-9 foi estatisticamente significativa

6 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide bucal é a neoplasia maligna mais comum encontrada na boca. Em geral, a transformação do epitélio normal para carcinoma epidermóide ocorre após múltiplos passos envolvendo ativação seqüencial de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor. Porém, a complexidade que envolve o mecanismo da carcinogênese não nos deixa pensar de maneira simplista, pois inúmeras características fenotípicas adquiridas permitem a célula maligna proliferar rapidamente e ilimitadamente, invadir tecidos adjacentes, sobreviver fora do seu microambiente normal e finalmente metastizar.

Alterações no gene supressor de tumor PTEN têm sido detectado em vários tipos de neoplasias como glioblastomas, próstata, mama, endométrio, pele e rim (LI et al., 1997; STECK et al., 1997), e mais recentemente nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (PEDRERO et al., 2005, LEE et al., 2001).

Entretanto, resultados controversos têm sido relatados na literatura em relação à contribuição do gene PTEN na carcinogênese dos CE de cabeça e pescoço. Para Pedrero et al. (2005), o resultado da ativação do oncogene Akt foi consequência da perda ou da redução da expressão de PTEN. Outros autores também relatam que a perda da expressão de PTEN não é um evento incomum, podendo ser um bom marcador de prognóstico para os CEB (LEE et al., 2001, SQUARIZE; CASTILHO; PINTO JÚNIOR, 2002). Por outro lado há autores que não encontraram alterações significativas desse gene nos CEB (SNADDON et al., 2001; CHEN et al., 2000; MAVROS et al., 2002).

Nesse contexto, buscamos avaliar a expressão de PTEN e Akt em células derivadas de carcinoma epidermóide bucal submetidas ao processo de invasão *in vitro*. Através do cultivo primário, linhagens celulares derivadas de CEB (HN6, HN30 e linhagem metastática HN31) e de queratinócitos com mutação no p53 (HaCat), foram crescidas no compartimento superior da câmara de invasão (*transwell*) que continha uma fina camada de Matrigel, uma membrana basal reconstituída. A câmara de invasão possuía poros de 8µm, menores que o diâmetro celular, portanto, somente células com capacidade de invadir o Matrigel ativamente conseguiram passar através dos poros. Esses clones celulares selecionados e potencialmente invasivos foram chamados por nós de HN6.1, HN30.1, HN31.1 e HaCat.1. Vale salientar que a linhagem controle de queratinócitos HaCat invadiu o Matrigel possivelmente por possuir mutação no gene p53.

Essas linhagens celulares, com capacidade de invasão, foram cultivadas por mais quatro passagens e assim, usadas em nossos experimentos. Isso porque a partir da quarta passagem, os aspectos imunofenotípicos e subcelulares das células tratadas tornam-se constantes e inalterados.

Os resultados obtidos em imunofluorescência não revelaram importantes mudanças na distribuição intracelular de PTEN nas células tratadas em relação ao grupo controle. Sua marcação foi citoplasmática, porém, diferentes padrões de marcação foram observados (linear próximo à membrana celular, citoplasmático em forma de rede e citoplasmático em forma de vesículas), provavelmente devido a diferentes momentos e atuações que este anticorpo pode exercer na célula. A literatura confirma a marcação em forma de rede (LI; SUN, 1997) e destaca que este tipo de marcação pode estar associado ao fato do PTEN conter seqüências com significativa homologia com a tensina, proteína presente no citoesqueleto (LI et al., 1997; STECK et al., 1997). A marcação pode se intensificar linearmente próximo à membrana celular

possivelmente por causa dos substratos PIP3 e FAK do PTEN pertencerem ou se deslocarem para próximo da membrana celular quando a célula recebe estímulos extracelulares (LEE et al., 1999), neste caso, o Matrigel. Já a marcação vesicular não foi descrita na literatura, mas observada por nós e precisa ser melhor decifrada.

Os resultados obtidos em imunofluorescência também mostraram intensa marcação pontual nuclear do pAkt tanto nas amostras tratadas, quanto nas controle. Com exceção da amostra HaCat.1 que adquiriu marcação predominantemente citoplasmática. Para Nicholson e Anderson (2002), células não estimuladas, em repouso, possuem a maioria dos resíduos de Akt/PKB no citoplasma. Sua ativação ocorre na membrana citoplasmática e sofre translocação tanto para o citosol quanto para o núcleo. Para Vara et al. (2004), em estágios avançados Akt é translocado, através de mecanismos desconhecidos, para o núcleo onde muitos substratos estão localizados. Logo, para nós esta marcação citoplasmática da HaCat.1 pode significar uma diminuição de Akt fosforilado. Esta diminuição confirmou-se pelo Western blot. Provavelmente esse clone invadiu o Matrigel e posteriormente adquiriu um caráter de menor invasividade, de menor proliferação, pois essa membrana basal reconstituída tem a capacidade de influenciar o comportamento celular, através da interação célula-substrato.

A técnica do Western blot revelou que todas as linhagens celulares controle possuem quantidade semelhante de PTEN. Apesar de aparentemente contraditório, a presença de PTEN em uma variedade de linhagens de células neoplásicas tem permitido melhor definir seu papel no controle do ciclo celular e na supressão tumoral (DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000). Observamos relativa diminuição do PTEN, porém não estatisticamente significativa, das amostras tratadas derivadas de CEB (HN6.1 e HN30.1 e HN31.1). A linhagem HaCat.1 foi a que apresentou uma diminuição significativa ($p < 0.05$) de PTEN. Provavelmente a perda ou diminuição da expressão de

PTEN seja um fator importante na seleção inicial e expansão de células durante a transformação.

A regulação negativa de PTEN também leva a célula neoplásica a uma maior capacidade invasiva. O caráter a ser adquirido provavelmente dependerá do ambiente em que a célula se encontra, seu estágio de desdiferenciação, levando ao estabelecimento de um maquinário específico para o fim necessário. Provavelmente, a linhagem HaCat precisou adquirir esse fator (diminuição de PTEN) mais que as linhagens de CEB.

A técnica de Western blot também revelou que as linhagens HN6, HN30 e HaCat possuem quantidades semelhantes de pAkt. Inesperadamente, a linhagem celular que apresentou menor quantidade desse oncogene foi a metastática HN31. É sabido que diferentes mecanismos e vias de ativação estão envolvidos na metástase, que divergem dos tumores primários. Provavelmente os carcinomas metastáticos, no início, crescem mais devagar até se estabelecerem como reais tumores.

Os clones invasivos apresentaram aumento não significativo desse oncogene, e diferentemente, a amostra HaCat.1 mostrou uma diminuição significativa de pAkt. Provavelmente essa linhagem sofreu diferenciação e adquiriu menor caráter proliferativo. A inativação ou diminuição do Akt pode induzir a expressão de fatores pró-apoptótico como o Faz ligante. Notamos que a quantidade tanto do pAkt quanto de PTEN diminuíram na amostra HaCat.1.

Provavelmente, a via PI3K/Akt/PTEN não é a envolvida em estágios iniciais de invasão das linhagens celulares aqui estudada. Porém, a presença do pAkt denota o seu envolvimento no processo, talvez atuando na progressão do tumor. Isso diverge, em partes, dos resultados obtidos por Pedrero et al. (2005), que mostraram que a amplificação do oncogene PIK3 é um evento inicial freqüente nos CE de cabeça e

pescoço, pois alterações genéticas neste oncogene (PIK3CA) estavam presente em 39% das lesões pré-malignas estudadas.

Vale ressaltar que o padrão de sinalização PI3K/Akt/PTEN é estudado não somente pelo seu possível papel no desenvolvimento neoplásico, mas também por estar se tornando um potencial alvo para desenvolvimento de novas drogas antineoplásicas. Em se tratando de invasão celular, nossos resultados mostram uma tendência não significativa da diminuição de PTEN e do aumento do pAkt, com exceção da HaCat.1 que apresentou diminuição de ambas as proteínas. Assim, a via PI3K/Akt/PTEN parece não ser tão linear quanto suponhamos e outras proteínas devem ser analisadas conjuntamente em experimentos futuros. A amostra tratada de queratinócitos se comportou de maneira diferente das outras, provavelmente adquirindo características de diferenciação induzida pelo Matrigel.

Nossos resultados demonstram que as linhagens HN6, HN30, HN31 e HaCat secretam gelatinases com pesos moleculares de 84 e 72 kDa. Acreditamos que representem a MMP-9 na sua forma ativa e a MMP-2 latente. Esta possibilidade é baseada no fato de estas enzimas corresponderem aos pesos moleculares das MMPs citadas acima, suas atividades serem inibidas pelo EDTA e degradarem o gel de gelatina, cujo substrato é o mais indicado para detectar estes tipos de gelatinases, oferecendo excelente sensibilidade para sua detecção (FISHER; WERB, 1995). Em relação às células tratadas, houve aumento da produção da MMP-2 latente pela HN30.1, HN31.1 e HaCat.1, enquanto a HN6.1 teve a secreção diminuída. As linhagens HN6.1 e HN31.1 tiveram a produção da MMP-9 ativa aumentada. Nota-se que somente a linhagem metastática HN31.1 apresentou aumento da produção de ambas as formas de metaloproteinases.

As metaloproteinases, em especial a MMP-2 e MMP-9, tem sido descritas como enzimas chaves no processo de invasão e metástase, por sua capacidade em

degradar colágeno tipo IV, um importante componente da matriz extracelular. Entretanto a correlação da expressão dessas enzimas com estágios clínicos, envolvimento de linfonodos e grau histológico ainda são relativamente controversos, inclusive em relação aos CE de cabeça e pescoço (KATAYAMA et al., 2004).

Patel et al. (2005) observaram o aumento das MMP-2 e MMP-9, em tecidos malignos derivados de pacientes com CE quando comparados aos tecidos normais adjacentes. Já Katayama et al. (2004) encontraram significativa correlação entre a expressão de MMP-9 com presença de linfonodo regional e/ou metástase à distância, e prognóstico pobre. Isso vai de encontro com nossos achados, onde 2 das 3 linhagens de CE tiveram aumento significativo de MMP-9 ativa, e entre elas, encontra-se a linhagem metastática. As linhagens HaCat e HaCat.1 não apresentaram produção de MMP-9.

Vale ressaltar que há estudos demonstrando acentuada produção de metaloproteinases estimulada pelo Akt, favorecendo a invasão tecidual e metástase (THANT et al., 2000). Especialmente através da metaloproteinase 9. Entretanto no nosso trabalho não pudemos relacionar o aumento pouco significativo do pAkt com o aumento significativo de produção da MMP-9 pelas HN31.1 e HN6.1. Por sua vez, a interação entre pAkt e MMPs não pode ser descartada.

Por fim, nossos resultados enfatizam a dificuldade em se estabelecer um padrão de inter-relação e sinalizações dentro de uma neoplasia devido a heterogeneidade de expressão gênica e protéica encontrada, além de diferentes vias de sinalizações poderem estar envolvidas em diferentes etapas de sua evolução.

7 CONCLUSÕES

- Não há uma relação inversa consistente e significativa entre as proteínas PTEN e Akt no processo de invasão *in vitro* com células derivadas de CEB.
- Não há somente um padrão de sinalização PTEN-PI3K-Akt no processo de carcinogênese dos CEB. E aparentemente ele não está atuando nos estágios iniciais do processo de invasão tumoral, mas sim na progressão da neoplasia.
- No processo de invasão *in vitro* a linhagem HaCat.1 se comportou diferente das linhagens derivadas de CEB e provavelmente sofreu diferenciação
- Um aumento estatisticamente significativo de secreção de MMP-9 ativa foi observado em 2 das 3 linhagens de CEB estudadas.

REFERÊNCIAS ¹

Andjelkovic M, Jones PF, Grossniklaus U, Cron P, Schier AF, Dick M, et al. Developmental regulation of expression and activity of multiple forms of the drosophila rac protein kinase. J Biol Chem 1995;270:4066-75.

Assoian RK, Schwartz MA. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. Curr Opin Genet Dev 2001;11:48-53.

Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cel invasion and metastasis. Cancer 1993;71:1368-83.

Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. Science 1991;254:274-7.

Borgatti P, Martelli AM, Bellacosa A, Casto R, Massari L, Capitani S, et al. Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. Febs Lett. 2000;477:27-32.

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

Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer Statistics. CA Cancer J Clin 1992;42:127-8.

Brown J, O'Prey J, Harrison PR. Enhanced sensitivity of human oral tumors to the flavonol, morin, during cancer progression: involvement of the Akt and stress kinase pathways. Carcinogenesis 2003;24:171-7.

Chen Q, Samaranayake IP, Zhou H, Xiau I. Homozygous deletion of the PTEN tumour-suppressor gene is not a feature in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 2000;36:95-6.

Cheng JQ, Altomare DA, Klein MA, Lee WC, Kruh GD, Lissy NA, et al. Transforming activity and mitosis-related expression of the AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and oncogenesis. Oncogene 1997;14:2793-801.

Coffer PJ, Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. Eur J Biochem 1992;205:1217.

Dahia PL, Aguiar RCT, Alberta J, Kum JB, Caron S, Sill H, Marsh DJ, Ritz, Freedman A, Stiles C, Eng C. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies. Hum Molec Genet 1999;8:185-93.

Das S, Dixon JE, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. Proc Natl Acad Sci 2003;100:7491-6.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three AKTs. *Genes Development* 1999;13:2905-27.

Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000;100:387-90.

Dufner A, Andjelkovic M, Burgering BM, Hemmings BA, Thomas G. Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1999;19:4525-34.

Ferguson KM, Kavran JM, Sankaran VG, Fournier E, Isakoff SJ, Skolnik EY, et al. Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 2000;6:373-84.

Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1990;50:6130-8.

Filippa N, Sable CI, Hemmings BA, Van Obberghen E. Effect of phosphoinositide-dependent kinase 1 on protein kinase B translocation and its subsequent activation. *Mol Cell Biol* 2000;20:5712-21.

Fisher SJ, Werb Z. The catabolism of extracellular matrix components. In: Haralson MA, Hassell JR, editors. *Extracellular matrix: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 1995.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidranski D. Head and neck cancer. N Engl J Med 2001;345:1890-1900.

Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3^a ed. New York: Wiley-Liss, 2000.

Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. J Cell Biol 1998;143:1375-83.

Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and-9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. Oral Oncol 2000;36:207-13.

Hopkin K. A suprising function for the PTEN tumor supressor. Science 1998;282:1027-1030.

Ikebe T, Shinohara M, Takeuchi H, Beppu M, Kurahara S, Nakamura S. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. Clin Exp Metastasis 1999;17:315-23.

INCA. Estimativas 2005. Incidência de Câncer no Brasil. 2004. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, 94p. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>>. Acessado em 06 de outubro de 2005.

Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:4171-5.

Jordan RC, Daley T. Oral squamous cell carcinoma: new insights. *J Can Dent Assoc* 1997;63:517-8, 521-5.

Katayama A, Bando N, Kishibe K, Takahara M, Ogino T, Nonaka S, et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:634-640.

Kato K, Hara A, Kuno T, Kitaori N, Huilan Z, Mori H, et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral squamous cell carcinoma: manifestation and localization of their activity. *J Cancer res Clin Oncol* 2005;131:340-6.

Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 1986;25:312-8.

Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous B-catenin. *Clin Cancer Res* 2004;10:5455-5463.

Lee JI, Soria JC, Asan KA, El-Nagar AK, Tang X, Liu DD, et al. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:1441-5.

Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 1999;323-34.

Li D, Sun H. TEP1, Encodes by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor B1. *Cancer Res* 1997;57:2124-9.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang S, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997;275:1943-6.

Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, et al. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 2000;6:385-94.

Lu Y, Lin Y-Z, Lapushin R, Cuevas B, Fang X, Yiu SX, et al. The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene* 1999;18:7034-45.

Macfarlane GJ, Evstifeeva TV, Robertson C, Boyle P, Scully C. Trends of oral cancer mortality among females worldwide. *Cancer Causes Control* 1994;5:255-8.

Maehama T, Dixon JE. PTEN: a tumor suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends in Cell Biology* 1999;9:125-8.

Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11598-603.

Mavros A, Hahn M, Wieland I, Koy S, Koufaki ON, Strelocke K, et al. Infrequent genetic alterations of the tumor suppressorgene PTEN/MMAC1 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 2002;31:270-6.

Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. *J Biol Chem* 1997;272:30491-7.

Morimoto AM, Tomlinson MG, Nakatani K, Bolen JB, Roth RA, Herbst R. The MMAC1 tumor suppressor phosphatase inhibits phospholipase C and integrin-linked kinase activity. *Oncogene* 2000;19:200-9.

Munshi HG, Ghosh S, Mukhopadhyay S, Wu YI, Sen R, Green KJ, et al. Proteinase suppression by E-cadherin-mediated cell-cell attachment in premalignant oral keratinocytes. *J Biol Chem* 2002; 277:38159-67.

Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:13513-8.

Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004;6:117-27.

Nagler R. Oral cancer – nuclear acid and genomic aberrations. Harefuah, 2003;142:862-6, 876.

Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ, et al. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. J Biol Chem 1999;274:21528-32.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Oral e Maxilofacial. 2^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan; 2004.

Ng SSW, Tsao MS, Chow S, Hedley DW. Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. Cancer Res 2000;60:5451-5.

Nicholson KM, Anderson NG. The protein Kinase B / AKT signalling pathway in human malignancy. Cellular Signalling 2002;14:381-95.

Ossowski L. Experimental model of invasion and metastasis, can they provide reliable answer for the role of proteases in cancer? Braz J Med Biol Res 1996;29:1099-103.

Pace S, Chiariello M, Murga C, Gutkinds JS. Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. J Biol Chem 1999;274:19347-51.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993;54:594-606.

Patel V, Ensley JF, Gutkind JS, Yendall WA. Induction of apoptosis in head-and-neck squamous carcinoma cells by gamma-irradiation and bleomycin is p53-independent. *Int J Cancer* 2000;88:737-43.

Patel BP, Shah PM, Rawal UM, Desai AA, Shah SV, Rawal RM, Patel PS. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 2005;90:81-8.

Pedrero JMG, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3-K/Akt/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2005;114:242-8.

Sapp JP, Eversole IR, Wysocki GP. Contemporary oral and facial maxillofacial pathology. St. Louis: Mosby; 1997.

Sidransky D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 1995;7:229-33.

Silverman Jr S. Early diagnosis of oral cancer. *Cancer* 1988;62(8Suppl):1796-9.

Snaddon J, Parkinson EK, Craft JA, Bartholomew C, Fulton R. Detection of functional PTEN lipid phosphatase protein and enzyme activity in squamous cell carcinomas of the head and neck, despite loss of heterozygosity at this locus. *Br J Cancer* 2001;84:1630-4.

Squarize CH. Estudo comparativo da expressão imunoistoquímica de PTEN e da graduação histológica de malignidade em carcinomas epidermóides bucais [Dissertação de Mestrado] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2002.

Squarize CH, Castilho RM, Pinto Jr DS. Immunohistochemical evidence of PTEN in OSCC and its correlation with the histological malignancy grading system. *J Oral Pathol Med* 2002;31:1-6.

Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 1987;84:5034-7.

Steack PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Igon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Genetics* 1997;15:356-62.

Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993;7:1434-41.

Sudbo J, Reith A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. *Int J Cancer* 2005;115:339-45.

Testa JR, Bellacosa A. Akt plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:10983-5.

Thant AA, Nawa A, Kikkawa F, Ichigotani Y, Zhang Y, Sein TT, et al. Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:423-8.

Thompson FH, Nelson MA, Trent JM, Guan XY, Liu Y, Yang JM, et al. Amplification of 19q13.1-q13.2 sequences in ovarian cancer. G-band, FISH, and molecular studies. *Cancer Genet Cytogenet* 1996;87:55-62.

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

Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro K, Kimura-Yanagawa T, Hino S, et al. Role of HGF/C-MET system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells *in vitro* and its clinical significance. *Int J Cancer* 2001;93:489-96.

Vara JAF, Casado E, Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzales-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and câncer. *Cancer Trat Reviews* 2004;30:193-204.

Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Vallejo GH. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2005;41:283-93.

Vokes EE, Weinhselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N*

Engl J Med 1993;328:184-94.

Weng IP, Smith WM, Dahia PL, Ziebold U, Gil E, Lees JA, et al. Cancer Res 1999;59:5808-14.

Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. Mol Pathol 2000;53:165-72.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. Nat Cell Biol 2001;3:245-52.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 122/04

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *"Estudo da expressão das proteínas PTEN e Akt em células derivadas de carcinoma epidermóide bucal em câmara de invasão"*, de responsabilidade da Pesquisadora **Ana Carolina Thomé Capuano**, sob orientação do Prof. Dr. **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, 17 de agosto de 2004

Profª Drª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP