HÉLDER ANTÔNIO REBELO PONTES

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS METALOTIONEÍNA, pAKT e NF-κB
COMO MARCADORES DE PROGNÓSTICO DE
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA**

**São Paulo
2008**

Hélder Antônio Rebelo Pontes

Avaliação imunoistoquímica das proteínas metalotioneína, pAKT e NF- κ B como marcadores de prognóstico de carcinomas epidermóides de boca

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
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pontes HAR. Avaliação imunoistoquímica das proteínas metalotioneína, pAKT e NF- κ B como marcadores de prognóstico de carcinomas epidermóides de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo,/...../.....

Banca Examinadora

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

Titulação:_____

Julgamento: _____Assinatura:

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

Titulação:_____

Julgamento: _____Assinatura:

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

Titulação:_____

Julgamento: _____Assinatura:

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

Titulação:_____

Julgamento: _____Assinatura:

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

Titulação:_____

Julgamento: _____Assinatura:

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha mulher Flávia,
eterna tábua de salvação e
à minha filha Ana Luísa, minha luz.*

*Aos Meus queridos pais,
Ariosto e Marizete.
Meus exemplos de amor.*

*O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem
momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Décio, dizer que ter sido seu aluno foi mais que um prêmio é pouco, porque você soube encontrar, em cada situação, a mais pertinente técnica para comunicar sua mensagem e fazê-la inteligível, aliás, coisa típica de quem nasceu para ensinar. Sua preocupação em dar o melhor de si, deixou patente sua irrefutável vocação para o magistério. Ganhei eu, ganhamos todos. Por isso, nestas breves, mas sinceras palavras, o penhor de minha gratidão. Segundo Jean-Paul Sartre, “O homem nada mais é do que aquilo que faz de si mesmo”, e você, Décio, fez-se um grande mestre.

AGRADECIMENTOS

Prof^a. Dra. Suzana C.O.M. Sousa, ainda que haja tantas coisas a dizer, em matéria de agradecimento, como e por onde começar a falar sobre o que a senhora, professora, representou para a consolidação de meus conhecimentos, numa área tão importante quanto complexa? Tentarei aqui ser o mais objetivo possível. Deixando de lado o sentimentalismo demagógico, posso dizer que sua conduta como mestra, creia-me, não excedeu a minha expectativa, porque sua competência a coloca na extirpe dos grandes, zelosos, dedicados e sábios mestres. Professora, devo-lhe tanto que dizer apenas obrigado, seria, de minha parte, uma incomensurável ingratidão. Que Deus a proteja sempre!

Prof. Dr. Fabio D. Nunes, o convívio diário mostrou-me um modelo de pesquisador a ser alcançado por todos os pós-graduandos. Saiba que a distância territorial que nos separa não enfraquecerá a admiração e a amizade que tenho por você. Obrigado amigo.

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

Edna Toddai (in memoriam) é extremamente difícil escrever sobre a pessoa que representou tão bem a figura de mãe. Guardarei seus ensinamentos e conselhos, pois sei que são valiosos e foram transmitidos com amor. Minha eterna gratidão.

Elisa e Zilda, vocês representam a essência da frase de Santo Agostinho: “Ser feliz é levar felicidade aos outros”. Obrigado por tudo.

Às funcionárias da FOU SP, que sempre com amizade e carinho me ajudaram a superar os obstáculos do cotidiano: Nair Pereira, Néia Barbosa, Patrícia Leonel e Beatriz Costa.

Amigo Sérgio Cury, William Shakespeare disse certa vez: “Eu aprendi que não importa quanta seriedade a vida exija de você, cada um de nós precisa de um amigo brincalhão para se divertir junto”. O quanto nos angustiamos? O quanto estudamos? O quanto nos ajudamos? O quanto nos preocupamos e torcemos um pelo outro? E acima de tudo o quanto nos divertimos? Sinto falta das nossas conversas, mas agradeço a Deus a oportunidade de ter convivido com você. Obrigado irmão.

Amigo Marcos Squadrans, não esquecerei sua preocupação comigo e minha família durante o curso. Você é um daqueles amigos que confirma a assertiva de Machado de Assis: “A amizade sente-se não se diz”. Obrigado por tudo.

Érika Pedreira, Brunno, Fernanda Yamamoto, Flávia Caló, Camila Rodinni, Fábio Coracin, Patrícia Adachi, Paulo Sérgio e Tessa, vocês tornaram atuais a frase de Antoine de Saint-Exupéry: “Num mundo que se faz deserto, temos sede de encontrar um amigo”.

Aos meus queridos colegas de Pós-Graduação Tatiana Libório, Kívia Linhares, Márcia Campos, Thais Acquafreda, Marina Moura, Yonara, Juliana, Renata, Alexandra, Paulo Braz, Alexandre Fraige, Alexandre, Epicuro, mencionou que: Não é tanto a ajuda dos nossos amigos que nos conforta, mas o confiante saber de que eles nos ajudarão. Obrigado pelo carinho.

Pontes HAR. Avaliação Imunoistoquímica das proteínas metalotioneína, pAKT e NF- κ B como marcadores prognósticos de carcinomas epidermóides de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

O carcinoma epidermóide é a neoplasia maligna que ocorre com maior frequência na boca. Os pacientes portadores desta neoplasia ainda apresentam um pobre prognóstico com índices de sobrevida, em cinco anos, variando de 20 a 40% em vários estudos. Um grande número de trabalhos tem sido direcionado para identificar marcadores que auxiliem no direcionamento do tratamento e melhorem o prognóstico. A metalotioneína (MT) é uma proteína de baixo peso molecular, com alto conteúdo de cisteína e que está associada à resistência neoplásica a várias modalidades de tratamento, e que por isso tem sido estudada como fator prognóstico em uma variedade de neoplasias malignas humanas. O Fator Nuclear κ B desempenha um importante papel na ativação de genes que estão relacionados à imunidade, inflamação, sobrevida, apoptose, proteção celular à radiação e à quimioterapia. A proteína serina/treonina quinase Akt é um alvo *downstream* da quinase 3-fosfaditilinositol, desempenhando um importante papel na proliferação e no bloqueio da apoptose de células cancerígenas. Neste estudo, nós examinamos a expressão das proteínas MT, NF- κ B e pAKT em 51 casos de carcinomas epidermóides de boca, através de imunoistoquímica, com a finalidade de investigar suas influências prognósticas, assim como estudar as correlações entre alguns fatores clínicos com a sobrevida. Os resultados mostraram uma associação estatisticamente significativa entre a expressão pAkt e NF- κ B e entre MT e NF- κ B. Ao lado disso, nossos

resultados mostraram que a expressão de pAkt está associada a um pior prognóstico. Nossos resultados, portanto, sugerem que a proteína pAkt pode ter implicações terapêuticas em carcinomas epidermóides de boca.

Palavras-Chave: carcinoma epidermóide, Akt, metalotioneína, NF- κ B, sobrevida.

Pontes HAR. Immunohistochemical evaluation of Metallothionein, pAkt and NF- κ B proteins as prognostic factors of Oral Squamous Cell Carcinoma. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most frequent malignant tumor of the oral cavity. In spite of improved therapeutic procedures, patients with OSCC in advanced stage generally present a poor prognosis, with an overall 5-year survival rate that ranges from 20% to 40%. An extensive effort has started to identify features of the oral tumors that predict treatment response and prognosis. The metallothionein (MT), a low-molecular weight protein with high cysteine content, seems to be related to neoplastic resistance to oncologic treatment and therefore has been studied as a prognostic factor for a variety of human malignant tumors. The nuclear factor κ B (NF- κ B) plays an important role in the activation of the genes that code for immunity, survival, inflammation, apoptosis and in the cell protection for radiation and chemotherapy. The serine/threonine protein kinase Akt is a downstream target of phosphatidylinositol-3-kinase and it plays a key regulator of cancerous cell growth. Therefore, we have examined the MT, NF- κ B and pAkt expression in 51 samples of oral squamous cell carcinoma by immunohistochemistry in order to investigate their prognostic influence on oral cancer, as well as studying the correlations between clinical factors and patient survival. The results showed a significant association between pAkt and NF- κ B and between MT and NF- κ B expression in tumor tissue. Besides pAkt over-expression was found in OSCC clinical samples and its expression was significantly associated with a poor overall patient survival. In conclusion, our findings suggested that pAkt expression may have therapeutic implications in squamous cell carcinoma.

Keywords: metallothionein, NF- κ B, pAkt, survival.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 4.1 – Dados clínicos coletados.....	71
Quadro 4.2 – Dados clínicos coletados.....	72
Quadro 4.3 – Classificação clínica TNM.....	73
Quadro 4.4 – Estadiamento TNM.....	73
Quadro 5.1 – Imunomarcações das proteínas pAkt, metalotioneína e NF-kB.....	79
Tabela 5.1 – Distribuição da presença das proteínas.....	80
Tabela 5.2 – Distribuição das proteínas avaliadas pelo Qui-Quadrado de Aderência com correção de Yates, GL=1.....	81
Tabela 5.3 – Avaliação da discordância na ocorrência de proteínas.....	82
Tabela 5.4 – Distribuição da proporção de sobreviventes e da taxa de risco em função do tempo	93
Tabela 5.5 – Variáveis preditoras pelo modelo de Cox.....	96
Tabela 5.6 – Distribuição do tamanho do tumor (T) conforme a presença das proteínas.....	96
Tabela 5.7 – Distribuição da recidiva conforme a presença de pAkt.....	97
Tabela 5.8 – Distribuição da recidiva conforme a presença de metalotioneína	97
Tabela 5.9 – Distribuição da recidiva conforme a presença de NF-kB.....	98
Tabela 5.10 – Distribuição do tabagismo conforme a presença de pAkt.....	98

Tabela 5.11 – Distribuição do tabagismo conforme a presença de NF-kB.....98

Tabela 5.12 – Distribuição do tabagismo conforme a presença de metalotioneí-
na.....99

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 – Imunoexpressão da proteína pAkt (Streptavidina-biotina 400X).....	88
Figura 5.2 – Imunoexpressão da proteína pAkt (Streptavidina-biotina 200X).....	88
Figura 5.3 – Imunoexpressão da proteína NF-kB (Streptavidina-biotina 200X).....	90
Figura 5.4 – Imunoexpressão da proteína NF-kB (Streptavidina-biotina 400X).....	90
Figura 5.5 – Imunoexpressão da proteína metalotioneína (Streptavidina - biotina 200X).....	92
Figura 5.6 – Imunoexpressão da proteína metalotioneína (Streptavidina - biotina 400X).....	92

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 – Distribuição da presença de proteínas.....	80
Gráfico 5.2 – Interação entre as proteínas.....	81
Gráfico 5.3 – Proporção de sobrevida em função do tipo de terapia, com ou sem cirurgia.....	82
Gráfico 5.4 – Proporção de sobrevida em função do estadiamento.....	83
Gráfico 5.5 – Proporção de sobrevida em função do consumo de álcool	84
Gráfico 5.6 – Proporção de sobrevida em função da idade 45 anos.....	84
Gráfico 5.7 – Proporção de sobrevida em função da localização da neoplasia.....	85
Gráfico 5.8 – Proporção de sobrevida em função do sexo do paciente.....	86
Gráfico 5.9 – Proporção de sobrevida em função do tabagismo.....	86
Gráfico 5.10 – Proporção de sobrevida em função da presença de pAkt.....	87
Gráfico 5.11 – Proporção de sobrevida em função da presença de NF-kB.....	89
Gráfico 5.12 – Proporção de sobrevida em função da presença de metalotioneí- na.....	91
Gráfico 5.13 – Gráfico de Kaplan-Meyer da curva de sobrevida geral.....	93
Gráfico 5.14 – Cox survival hazard, variável cirurgia.....	94
Gráfico 5.15 – Cox survival hazard de pAkt.....	95
Gráfico 5.16 – Cox survival hazard, etilismo.....	95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Carcinoma epidermóide bucal.....	22
2.2 Akt	27
2.2.1 Relação da proteína Akt com as neoplasias malignas, com a sobrevida e com resistência às drogas antineoplásicas	36
2.3 NF-κB	43
2.3.1 NF-κB e regulação da apoptose	53
2.3.2 Regulação da proliferação, angiogênese, invasão e metástase.....	56
2.3.3 NF-κB e neoplasias malignas	57
2.3.4 Relação da proteína NF-κB com a sobrevida e resistência às drogas anti- neoplásicas.....	58
2.4 Metalotioneína	60
2.4.1 Funções do Zn Regulados pela metalotioneína.....	66
2.4.2 Localização da metalotioneína na célula	67
3 PROPOSIÇÃO	69
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	70
4.1 Amostras dos tecidos.....	70
4.2 Técnica de imunoistoquímica.....	74
4.3 Análise da imunomarcacão.....	76
4.4 Análise estatística.....	77
5 RESULTADOS.....	79
5.1 Imunomarcações das proteínas pAkt, NF-κB e metalotioneína.....	79

5.2 Distribuição da imunoexpressão das proteínas pAkt, NF-kB e metalotioneína	80
5.3 Análise das variáveis clínicas em função da sobrevida	82
5.3.1 Variável cirurgia	82
5.3.2 Variável estadiamento	83
5.3.3 Variável etilismo	83
5.3.4 Variável idade ≥ 45 anos	84
5.3.5 Variável localização (língua e soalho)	85
5.3.6 Variável sexo	85
5.3.7 Variável tabagismo	86
5.4 Análise das proteínas pAkt, NF-kB e metalotioneína em relação à sobrevida	87
5.4.1 Variável pAkt	87
5.4.2 Variável NF-kB	89
5.4.3 Variável metalotioneína	91
5.5 Análise da curva de sobrevida	93
5.6 Análise do modelo de risco proporcional de Cox	94
5.7 Variáveis preditoras pelo modelo de Cox	96
5.8 Distribuição do tamanho do tumor (T) conforme a presença das proteínas	96
5.9 Distribuição da recidiva conforme a presença de pAkt	96
5.10 Distribuição da recidiva conforme a presença de metalotioneína	97
5.11 Distribuição da recidiva conforme a presença de NF-kB	97
5.12 Distribuição do tabagismo conforme a presença de pAkt	98
5.13 Distribuição do tabagismo conforme a presença de NF-kB	98

5.14 Distribuição do tabagismo conforme a presença de metalotioneína.....	99
6 DISCUSSÃO.....	100
7 CONCLUSÕES.....	118
REFERÊNCIAS	119
ANEXO A.....	137

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide é a neoplasia maligna mais comum que afeta a boca. Apesar dos recentes avanços na cirurgia, na quimioterapia e na radioterapia, o prognóstico dos pacientes portadores dessa neoplasia não tem melhorado, com a taxa de sobrevida em cinco anos ficando em torno de 30 a 50%, em várias partes do mundo (CHIN et al., 2005; VORA et al., 2003).

A avaliação prognóstica e decisões sobre estratégias de tratamento são baseadas, hoje, principalmente no sistema TNM (do inglês tumor, nodal, metástase). Tais fatores clínicos possuem, entretanto, somente limitado valor prognóstico para o carcinoma bucal. É importante identificar novos marcadores prognósticos que reflitam a agressividade da doença para fornecer caracterização terapêutica para os pacientes (VORA et al., 2003).

O fator de transcrição κB (NF- κB - do inglês Nuclear factor κB) está envolvido na ativação de genes e tem sido primariamente relacionado às respostas imunes e inflamatórias. NF- κB participa, também, de um conjunto de atividades celulares relacionadas à morte, crescimento e desenvolvimento celulares. A esse fator de transcrição tem-se dado grande relevância, tanto na iniciação como na progressão de vários tipos de neoplasias malignas, por ser fundamental na regulação da expressão de genes importantes que afetam a proliferação celular, invasão, angiogênese e metástase. Supressão da atividade de NF- κB tem mostrado reprimir o crescimento de uma variedade de células neoplásicas tanto em cultura como em camundongos. Além disso, a atividade antiapoptótica de NF- κB tem sido atribuído

um saliente papel na resistência das neoplasias malignas não só aos agentes quimioterápicos, como à radioterapia (ROSS et al., 2004; SUH; RABSON, 2004).

A Metalotioneína (MT) é uma proteína rica em cisteína, com peso molecular de aproximadamente 6000 Da com a capacidade de seqüestrar ou doar metais, e realizar, assim, um importante papel na atenuação ou amplificação da transdução de sinais no interior das células. Vários estudos sugerem um papel das MTs no desenvolvimento, resistência ao tratamento e no prognóstico de várias neoplasias malignas. Nesse sentido, muitos trabalhos mostram um aumento da expressão da MT em neoplasias de mama, cólon, rins, fígado, pulmão, ovário, próstata e tireóide. Esses efeitos se devem a capacidade da MTs de neutralizar sinais apoptóticos externos, assim como de seqüestrar agentes alcalinos, o que fornece resistência a drogas utilizadas na quimioterapia (CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; KIM et al., 2003; SATO; KONDOH, 2002; THEOCHRRIS et al., 2004).

A proteína pAkt/PKB faz parte da cascata de ativação da proteína PI3K (quinase 3-fosfaditilinositol) por uma variedade de fatores de crescimento. Substrato de Akt como BAD, caspase, FKHR e FKHL1 são componentes promotores de morte celular e inibição desses alvos promove sobrevivência. Por outro lado, a via do Akt aumenta proliferação celular ao induzir localização citoplasmática de algumas proteínas como mdm2 e p21^{Cip/WAF1} (ZHOU et al., 2001). Inúmeros estudos demonstraram a participação da proteína pAkt em carcinomas de mama, endométrio, próstata e pâncreas (CHADHA et al., 2006; CLARK et al., 2002; HU et al., 2003; LESSARD et al., 2003).

A expressão das proteínas NF- κ B, pAkt e MT não é igual em todas as neoplasias humanas, mas parece depender do nível de diferenciação, das mutações acumuladas, do índice de proliferação e do local de origem das neoplasias

(CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; LEE et al., 2005). A reação imunoistoquímica, nesse contexto, tem se mostrado uma técnica extremamente útil para associar as proteínas celulares aos aspectos clínicos e histológicos das diversas neoplasias humanas (LEE et al., 2005; LIM et al., 2005; NAKAYAMA et al., 2001).

A proposta deste trabalho é verificar a associação da expressão das proteínas metalotioneína, pAKt e NF-kB, analisada através de imunoistoquímica, e de alguns aspectos clínicos com a sobrevida de 51 pacientes com carcinomas epidermóides de boca.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide bucal

Conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), órgão do ministério da Saúde, o carcinoma de boca figura como a sexta mais comum neoplasia maligna, no Brasil, e para 2006, esperavam-se mais de 13 mil casos novos. O mais comum tipo de neoplasia maligna bucal é o carcinoma epidermóide, o qual é responsável por nove em dez lesões malignas diagnosticadas (LIM et al., 2005).

A situação do tratamento do carcinoma de boca é particularmente grave, visto que a maioria dos casos é diagnosticada tardiamente. A prevenção e o diagnóstico precoce são medidas eficazes para melhorar o prognóstico do carcinoma de boca. O diagnóstico precoce das neoplasias não deveria apresentar grandes dificuldades, uma vez que os grupos de maior risco são bem conhecidos e a região é de fácil acesso ao exame clínico, dispensando qualquer tipo de equipamento especial, além do fato de lesões com potencial maligno poderem ser diagnosticadas e tratadas antes da aquisição do fenótipo maligno. No entanto, observa-se que os pacientes, por não serem devidamente esclarecidos, negligenciam os sintomas, e os profissionais da área de saúde, por seu turno, não examinam rotineiramente a mucosa bucal.

O tabaco possui um papel bem estabelecido na etiologia do carcinoma epidermóide bucal. Em diversos estudos epidemiológicos, ficou claramente demonstrado não somente o alto risco de carcinoma de boca nos tabagistas, como

também um notável efeito dose-resposta (KARI et al., 1997). O tabaco chega a aumentar de quatro a dez vezes o risco de desenvolvimento de carcinoma epidermóide. Ademais quando o álcool está associado ao tabaco, o risco de desenvolver a malignidade pode chegar a 15 vezes (VARGAS et al., 2000). Jaber et al. (1999) afirmaram que o risco de desenvolvimento de displasia epitelial bucal diminui consideravelmente em pacientes que param de fumar por um período acima de 10 anos. Adicionalmente, o hábito de mascar tabaco, misturado com folhas de betel, é considerado como um dos maiores fatores de risco para o carcinoma epidermóide bucal em alguns países asiáticos como Índia, Paquistão e Sri-Lanka (LEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASSURYIA, 2001).

São encontrados no fumo inúmeros componentes químicos com poder comprovadamente carcinogênico. Esses compostos podem ser divididos em três grupos distintos: as nitrosaminas, presentes na fumaça produzida pela queima do fumo, os benzopirenos, que se apresentam sob a forma de partículas, e as aminas aromáticas, derivadas da nicotina. A nicotina é o maior constituinte do tabaco, sendo responsável por causar sua dependência. Especula-se que as nitrosaminas derivadas da nicotina, especialmente a nitrosamina N- nitrosonornicotina (NNN) e a 4- (metilnitrosamina -1-(3-piridil) -1- butanona (NNK) participam da carcinogênese do tabaco. A nicotina atua inibindo a apoptose ao controlar a ação de enzimas proteína kinase C e a proteína nitrogênica ativadora de kinase. Ao lado desses efeitos, a nicotina modula os fatores de crescimento $TNF-\alpha$ (fator de necrose tumoral α), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF- β (fator de crescimento transformante β) que, em conjunto, estimulam a proliferação celular (PRADO; TAVEIRA, 2003).

Os componentes químicos carcinogênicos presentes no tabaco apresentam-se como pró-carcinógenos, necessitando de enzimas, como oxigenases do citocromo p450 e peroxidases, que os convertam em um reagente eletrofílico, com deficiência de elétrons em determinadas regiões da molécula, com força para estabelecer ligação mais estável, covalente, com as macromoléculas intranucleares do DNA (CANTO; DEVESSA, 2002).

Ao consumo de álcool é atribuído um papel de promotor nos carcinomas epidermóides bucais, por promover um efeito sinérgico com o tabagismo. O exato mecanismo como o consumo de álcool resulta na elevação do risco de desenvolvimento de carcinoma bucal permanece obscuro, pois os consumos de fumo e álcool em geral coexistem nos indivíduos. Alguns mecanismos têm sido propostos: o álcool pode atuar como solvente, facilitando a passagem dos carcinógenos através da membrana celular; o etanol pode alterar enzimas microssomais envolvidas no metabolismo dos carcinógenos no fígado, e também ativar substâncias carcinogênicas, ou ainda ocasionar uma alteração do metabolismo intracelular das células epiteliais, que pode ser agravado por deficiências nutricionais. Entretanto, o etanol, isoladamente, não foi provado ser carcinogênico para a mucosa de boca (WARNAKULARIYA et al., 2008).

A neoplasia acomete, geralmente, pacientes a partir da sexta década de vida, sendo que pacientes com menos de 45 anos são considerados jovens (LAM; LOGAN; LUKE, 2006). Os homens são mais acometidos que as mulheres em uma proporção de 3 - 2:1, proporção esta que vem diminuindo com o passar dos anos, em função do aumento, entre as mulheres, do consumo de tabaco e álcool. A relação do aumento do carcinoma epidermóide de boca com a idade ocorre tanto pelo fato do simples aumento do tempo de exposição do indivíduo ao carcinógeno,

quanto pela alteração no equilíbrio metabólico e hormonal do indivíduo que propicia falha na defesa contra os processos de iniciação e promoção (CANTO; DEVESSA, 2002; CHEN; LIN; LIN, 1999; DURAZZO et al., 2005; HUSSEINNY et al., 2000; VORA et al., 2003).

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

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

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

presença de queratina tem sido sugerida como protetor da gengiva para os efeitos carcinógenos do fumo de tabaco (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000).

Uma dieta que inclua peixe fresco, vegetais ricos em betacarotenos, vitamina C e vitamina E tem sido associada com redução do risco de desenvolvimento de carcinoma epidermóide de boca. O tecido responde à agressão pelos carcinógenos do fumo através do processo de detoxificação ou antioxição. Isso se processa por meio da ação das enzimas glutathione-transferase (GST) e superoxidodismutase (SOD). Especula-se que uma maior ingestão de vitaminas antioxidantes (vitaminas A, C e E) melhore essa condição (CANTO; DEVESA, 2002).

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

A escolha do tratamento depende da localização e do tamanho do tumor primário, da idade e saúde geral do paciente, da morbidade associada ao tratamento, da experiência e habilidade do cirurgião e do radiologista oncológico, além dos anseios do paciente (HUSSEINY et al., 2000). Convém ressaltar que a radioterapia é a terapia de eleição para os casos avançados, independente do sítio bucal de acometimento, complementada, quando possível, com a cirurgia, ou mesmo associada à quimioterapia (HADDADIN et al., 2000).

Para Shingaki et al. (2003) a utilização de quimioterapia antes da cirurgia aumenta os índices de sobrevida e diminui consideravelmente a taxa de metástases à distância, quando comparado com seu uso após a cirurgia, e tem, como principal vantagem, a possibilidade de controle subclínico das metástases à distância. Os autores afirmam, ainda, que o uso de quimioterapia sistêmica adjuvante deve ser amplamente considerado em pacientes com envolvimento dos linfonodos.

2.2 pAkt

A proteína PKB/AKT foi caracterizada após o isolamento de dois genes chamados akt1 e akt2, identificados como homólogos do oncogene v-akt, o qual é sabido ser responsabilizado por um tipo de leucemia em camundongos. Posteriormente, dois estudos independentes revelaram que v-akt e seus genes homólogos codificavam uma proteína quinase que guardava semelhança com a proteína quinase C (VARA et al., 2004; WEST; CASTILO; DENNIS, 2002). A nova proteína foi chamada, então, de RAC (do inglês related to A and C kinases) ou PKB (do inglês protein kinase B) (NAVOLANIC; STEELMAN; McCUBREY, 2003; OGAWARA, 2002). Proteínas homólogas a Akt têm sido identificadas em uma variedade de espécies, incluindo pássaros, insetos e leveduras (KANDEL; HAY, 1999).

As três maiores isoformas de Akt/PKB, encontradas em células de mamíferos, são codificadas por três diferentes genes. Akt1, ou PKB α , foi a primeira isoforma isolada, Akt2/PKB β e Akt3/PKB γ foram posteriormente clonadas (CLARK et al.,

2002; NAVOLANIC; STEELMAN; McCUBREY, 2003; OGAWARA, 2002). Embora existam três isoformas de Akt, suas diferentes funções não foram completamente elucidadas (DAVID et al., 2004). Todos os subtipos de Akt/PKB parecem compartilhar substratos similares, além de todos serem expressos em mamíferos, embora os níveis de expressão sofram variação entre os tecidos (MEIER et al., 1997).

Akt1/ PKB α é o tipo predominante na maioria dos tecidos (KANDEL; HAY, 1999; LUO; MANNING; CANTLEY, 2003). Akt1 e Akt2 são expressas no cérebro, timo, fígado, coração, rins e pulmão e Akt3 no cérebro e testículos (MEIER et al., 1997; SHAH et al., 2005).

Todos os três genes de Akt possuem mais de 85% de identidade seqüencial e seus produtos protéicos possuem a mesma organização estrutural (HAY, 2005; VARA et al., 2004). Possuem um domínio PH (do inglês pleckstrin homology), com cerca de 100 aminoácidos na região N-terminal, responsável pela ancoragem aos fosfolipídios da membrana, seguido por um domínio catalítico relacionado à proteína quinase A e C e uma região regulatória C-terminal. Os resíduos treonina 308, localizados no domínio catalítico, e serina 473, localizado na região C-terminal, juntamente com domínio PH, são críticos para a ativação de Akt/PKB (ANDJELKOVIC et al., 1997; JENSEN; HUNTER, 2001; KANDEL; HAY, 1999; TSURUTANI et al., 2005; VARA et al., 2004). Meier et al. (1997) acrescentam, entretanto, que os aminoácidos treonina 308 e serina 473 são os locais de ativação de Akt α e os resíduos treonina 309 e serina 474 são os sítios de fosforilação de Akt β e que a fosforilação desses resíduos é evitada por uma substância chamada Wortmannin.

A proteína Akt/PKB faz parte da cascata de ativação da proteína PI3K (quinase 3-fosfatidilinositol), por uma variedade de fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento insulina, fator de crescimento epidermal, fator de crescimento de fibroblastos, interleucinas 3 e 6 e fator de crescimento do endotélio vascular (CLARK et al., 2002; MEIER et al., 1997; SHAH et al., 2005).

PI3K são heterodímeros compostos de uma subunidade catalítica, denominada p100, e uma subunidade adaptadora/regulatória, denominada p85 (JENSEN; HUNTER, 2001; MAYO; DONNER, 2002; NAVOLANIC; STEELMAN; McCUBREY, 2003). Ativação de PI3K deve ser acompanhada da ativação do receptor tirosinoquinase ou através da ativação de ras, que pode diretamente ativar a subunidade p110 com ausência de feitos sobre p85 (NAVOLANIC; STEELMAN; McCUBREY, 2003; VAZQUEZ; SELLERS, 2000).

A ligação da subunidade 85 kDa ao receptor traz a subunidade catalítica 110, kDa de PI3K próximo à membrana celular onde esta subunidade catalisa a fosforilação do fosfolipídiomiositol produzindo PIP3 (do inglês phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate). Em resumo, a subunidade adaptadora permite ativação alostérica da subunidade catalítica de PI3K, ou seja, ativação pela região da molécula enzimática que não representa o grupo ativo (HAY, 2005; JENSEN; HUNTER, 2001; KANDEL; HAY, 1999; MAYO; DONNER, 2002; VARA et al., 2004; WEST; CASTILO; DENNIS, 2002).

Ativação de PI3K, como mencionado anteriormente, permite a fosforilação de uma proteína chamada PIP2 (do inglês phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate), no grupo 3'-OH, levando a produção de PIP3 em poucos segundos (JENSEN; HUNTER, 2001). PIP3 é um mediador lipídico que recruta proteínas que contenham

um domínio PH (do inglês pleckstrin-homology) como Akt e PDKs (do inglês PtdIns(3,4,5)P₃ – dependent kinases) (MAYO; DONNER, 2002).

Ligação de PIP3 ao domínio PH induz uma alteração conformacional de Akt e seu recrutamento do citosol para a superfície interna da membrana plasmática, com conseqüente exposição de seus sítios de fosforilação treonina 308 e serina 473 (ANDJELKOVIC et al., 1997; BROGNARD et al., 2001; MAYO et al., 2002; MEIER et al., 1997; NAVOLANIC et al., 2003; VAZQUEZ; SELLERS, 2000; WEST; CASTILO; DENNIS, 2002). A translocação de Akt para a membrana plasmática é rápida, ocorrendo em dois minutos após estimulação por IGF (ANDJELKOVIC et al., 1997).

Na superfície interna da membrana plasmática encontra-se a proteína PDK1 (do inglês 3-phosphoinositide-dependent kinase), que é constitutivamente ativada (HAY, 2005; MAYO et al., 2002). Navolanic et al. (2003), entretanto, relataram, em seu artigo de revisão, que a proteína PDK1 é uma proteína recrutada para a membrana plasmática por PIP3, e Vazquez e Sellers (2000) relatam que a ativação de PDK1 é patrocinada por PI3K.

PDK1 uma vez na membrana plasmática fosforila Akt no seu resíduo T308, ativando-a (pAkt) (BROGNARD et al., 2001; HAY, 2005; TSURUTANI et al., 2005). A fosforilação do domínio regulatório S473 é também requerida para ativação completa de Akt1 (BROGNARD et al., 2001; TSURUTANI et al., 2005). PDK2 e ILK (do inglês protein kinase integrin-linked kinase) parecem ser as proteínas responsáveis pela ativação desse resíduo serina de Akt (CLARK et al., 2002; HAY, 2005; JENSEN, HUNTER, 2001; VARA et al., 2004). Akt2 é ativado nos resíduos serina 474 e treonina 309 e Akt3 nos aminoácidos serina 472 e treonina 305 (ARBOLETA et al., 2003).

pAkt β libera-se da superfície interna da membrana plasmática e passa a localizar-se no núcleo dentro 20 a 30 minutos após sua ativação por fatores de crescimento, indicando que alguns alvos da proteína Akt, que controlam a progressão do ciclo celular e apoptose estão localizados no núcleo, porém sua completo papel nuclear permanece desconhecido (ANDJELKOVIC et al., 1997; DAVID et al., 2004; JENSEN; HUNTER, 2001; KANDEL; HAY, 1999; MEIER et al., 1997). Feng et al. (2004) sugerem, que após ser ativado, PKB migra para o núcleo e posteriormente fosforila MDM2 no compartimento nuclear. As proteínas Akt1 e Akt2 parecem ter similares substratos *in vivo*, entretanto, as funções fisiológicas podem não ser as mesmas, uma vez que os níveis de ativação e especificidade celular são diferentes (ARBOLEDA et al., 2003).

A proteína Akt possui pouco ou nenhum efeito sobre p53, o que equivale dizer que p53 não serve como um substrato direto para a proteína Akt (FENG et al., 2004). Akt ativado fosforila, entretanto, Mdm2, uma ubiquitina ligase, nos aminoácidos serina 166 e serina 186, produzindo um aumento em sua localização nuclear, dessa forma, aumentando a degradação de p53, através de sua exportação para o citoplasma (MAYO et al., 2002; OGAWARA et al., 2002; VARA et al., 2004; VESTEY et al., 2005). Milne et al. (2004) relataram que a serina 188 é o principal sítio de fosforilação de MDM2 pela proteína Akt. Feng et al. (2004) e Kohn e Pommier (2005) afirmam que a fosforilação de MDM2 pela proteína Akt inibe a própria ubiquitinização de MDM2, por protegê-la de degradação dependente de proteossomo. Ogawara et al. (2002) acrescentam que a fosforilação de Mdm2, no aminoácido serina 186, afeta sua ligação à proteína p19^{ARF}, a qual é capaz de seqüestrar Mdm2 ligada a p53.

Na via do Wint, GSK3 (do inglês glycogen synthase kinase-3) fosforila axin, APC (do inglês adenomatous polyposis coli) e β -catenina, promovendo a interação de β -catenina com β -TrCP (do inglês β -transduction repeat containing protein), possibilitando, assim a ubiquitinação de β -catenina e sua posterior degradação pelo proteossomo. A proteína GSK-3 é fosforilada e inibida por pAkt, o que permite a translocação nuclear da molécula β -catenina, onde esta proteína associa-se com o fator de transcrição TCF/LEF-1 (do inglês T cell factor/lymphocyte enhancer binding factor-1), e propicia a transcrição da proteína ciclina D1 que, por sua vez, hiperfosforila a proteína Rb, de modo a estimular a progressão do ciclo celular (GRILLE, 2003; JENSEN; HUNTER, 2001).

GSK3 também fosforila ciclina D1 e Myc, duas proteínas que promovem a entrada na fase S. Uma vez fosforiladas, por GSK3, ciclina D1 e Myc são translocadas do núcleo para o citoplasma, e posteriormente degradadas. Assim, inativação de GSK3 β por pAkt também eleva os níveis de ciclina D1, por permitir seu acúmulo no núcleo. Ativação de NF κ B, um fator de transcrição, por Akt também estimula transcrição de ciclina D1 (NAVOLANIC et al., 2003).

Oren et al. (2002) relataram que beta-catenina pode inativar MDM2, além de permitir acúmulo de p53. Por outro lado, p53 pode promover a degradação de beta-catenina.

As proteínas P21^{Cip/WAF1} e P27^{Cip/WAF1} são membros da família Cip/Kip que podem inativar tanto as quinases dependentes de ciclina (CDKs- do inglês cyclin-dependent kinases) como as ciclinas, quando estímulos, como perda de adesão celular à matriz extracelular, dano no DNA, hipóxia e ativação de TGF- β (do inglês transforming growth factor- β), estiverem presentes. A expressão de P21^{Cip/WAF1} é induzida pela proteína p53 selvagem (SINGHAL et al., 2005; VIGLIETTO; MOTTI;

FUSCO, 2002). A atividade inibitória de p21^{Cip/WAF1} está fortemente relacionada com sua localização nuclear (WEST; CASTILO; DENNIS, 2002). A proteína pAkt fosforila a proteína p21, no aminoácido treonina 145, inibe sua atividade antiproliferativa, por retê-la no citoplasma, através da ligação a proteína 14-3-3. Um mecanismo similar tem sido descrito para a proteína inibitória p27 (GRILLE et al., 2003; NAVOLANIC et al., 2003; VARA et al., 2004; WEST; CASTILO; DENNIS, 2002). Blagosklonny (2002) acrescenta que, uma vez no citoplasma, a proteína p27 teria a função de bloquear a ativação de caspase 2 e a proteína p21 poderia bloquear caspase 3. Esses bloqueios contribuem para o bloqueio da apoptose.

A proteína Bad localiza-se no citoplasma e sob estímulo de IL-3, por exemplo, se fixa e inativa, em nível mitocondrial por heterodimerização, membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 como Bcl-x_L (DATTA et al., 1997; YANG et al., 1995). A fosforilação de Bad tanto nos resíduos serina 112 (via EGFR/Ras-Raf-MEK-MAPK) como em serina 136 (via EGFR/PI3K-Akt) impede sua ligação, em nível mitocondrial, às proteínas Bcl-x_L, por ligação à proteína 14-3-3 chaperone, prevenindo a liberação do citocromo c da mitocôndria (ADAMS; CORY, 1998; BROGNARD et al., 2001; DATTA et al., 1997; DEL PESO et al., 1997; FENG et al., 2004; GRILLE et al., 2003; KANDEL; HAY, 1999; MAYO; DONNER, 2002; SHE et al., 2005; VARA et al., 2004; WEST; CASTILO; DENNIS, 2002).

A caspase-9, que ativa caspase 3, desencadeando uma cascata de eventos moleculares que culminam com a apoptose, também é fosforilada e inativada por pAkt. Este, entretanto, não é o principal mecanismo de bloqueio da apoptose, em função do pAkt não ser capaz de bloquear a apoptose eficazmente após o citocromo c ser liberado (CARDONE et al., 1998; FENG et al., 2004; KANDEL; HAY, 1999; VARA et al., 2004).

Ainda em relação à interação de pAkt com as caspases, convém mencionar que baixa expressão de pAkt resulta em diminuição dos níveis da proteína FLIP (do inglês FLICE-inhibitory protein), que compete com a proteína pró-caspase 8 pela ligação à proteína FADD (do inglês Fas-associated protein with death domain), ligação esta necessária para a geração de caspase 8 (PUDUVALLI et al., 2005; THONNBERRY; LASEBNIK, 1998).

pAkt regula negativamente a atividade do fator de transcrição FKHRL1 da família *forkhead*. pAkt, ao fosforilar FKHRL1, provoca sua retenção citoplasmática por interações com proteínas 14-3-3, desse modo impedindo sua ação apoptótica, uma vez que FKHRL1 regula a transcrição do gene pró-apoptótico Fas-Ligant (BROGNARD et al., 2001; BRUNET et al., 1999; GRILLE et al., 2003).

A ativação de NFκB é executada através da ativação da quinase (IKKα) ou CREB, que liberam NF-κB do seu inibidor (IκB), permitindo, assim, a atividade transcricional de p65 Rel, uma subunidade de NFκB (KANDEL; HAY, 1999; MAYO; DONNER, 2002; VARA et al., 2004; WEST; CASTILO; DENNIS, 2002). Shah et al. (2005) acrescentam que pAkt ativa a transcrição do fator nuclear κB permitindo a transcrição de genes com atividade antiapoptótica e pró-inflamatória.

Alguns dos efeitos de proliferação da via PI3K/Akt são mediados pela cascata TSC1/TSC2/mTOR/ p70^{S6K}. Mutações nos genes que codificam TSC1 e TSC2 estão associadas a desordens genéticas, denominadas de TSC (do inglês tuberous sclerosis), que são caracterizadas pelo desenvolvimento de hamartomas. Desse modo, TSC1 e TSC2 são considerados supressores tumorais (HAY, 2005; KANDEL; HAY, 1999; WEST; CASTILO; DENNIS, 2002).

A proteína pAkt estimula o crescimento, por fosforilar TSC2, inibindo a formação do complexo TSC1:TSC2. Este complexo possui atividade GTPase e atua

inibindo atividade de Rheb, uma pequena GTPase requerida para ativação de mTOR (do inglês mammalian Target Of Rapamycin). Além disso, TSC2 é diretamente fosforilada e ativada pela quinase AMPK e Akt bloqueia a atividade desta quinase. Uma vez ativado, mTOR, forma um complexo sensível à rapamicina com Raptor (do inglês regulatory-associated protein of mTOR) e ativa a proteína quinase $p70^{S6K}$ que promove crescimento celular. A proteína mTOR também promove a dissociação de 4E-BP de seu inibidor eIF4E. A proteína 4E-BP possui a função de promover a transcrição de algumas proteínas (HAY, 2005; KANDEL; HAY, 1999; WEST; CASTILO; DENNIS, 2002).

Por controlar a síntese protéica, tanto de $p70^{S6K}$ como de 4E-BP1, a proteína pAkt estimula o crescimento celular e hipertrofia. Han, Khuri e Roman (2006) mostraram que a proteína fibronectina participa do carcinogênese de carcinomas de pequenas células do pulmão estimulando Akt, que por sua vez ativa a proteína mTOR.

Inibição da atividade de pAkt pode ser realizada por fosfatases, como a proteína PTEN (do inglês phosphatase and tensin homologue), também chamada de MMAC1 (do inglês mutated in multiple advances cancers), que remove fósforo, na posição 3' de PIP3, levando-o a PIP2. Este papel é desempenhado também por outra fosfatase denominada SHIP (do inglês SH2-containing inositol phosphatase) (CLARK et al., 2002; HAY, 2005; KANDEL; HAY, 1999; VARA et al., 2004; WEST; CASTILO; DENNIS, 2002).

SHIP desfosforila PIP3 na posição 5' e seu efeito parece restrito às células hematopoiéticas (BROGNARD et al., 2001). Leslie e Downes (2002) relataram, em seu estudo de revisão, que SHIP não interfere com os níveis basais de PIP3, uma vez que camundongos que perdem a atividade de SHIP conseguem se desenvolver.

Isto sugere que SHIP regula somente a magnitude e duração da ação deste lipídio. Brognard et al. (2001) relataram que a fosfatase mais provavelmente envolvida na regulação da atividade de pAkt em células de carcinomas de pulmão é a proteína PP2, a qual regula a função de Akt pela direta desfosforilação de S473 e T308.

2.2.1 Relação da proteína Akt com as neoplasias malignas, com a sobrevida e com resistência às drogas antineoplásicas

A Atividade de Akt é comumente desregulada em uma variedade de neoplasias humanas em função da inativação da fosfatase PTEN, localizada no cromossomo 10, que regula negativamente os níveis de Akt ativado (LEE et al., 2005; TANG et al., 2005).

Vários trabalhos comprovam a participação da proteína Akt na carcinogênese do pulmão (BLACKHALL et al., 2003; BROGNARD et al., 2001; DAVID et al., 2004; SHAH et al., 2005; TSURUTANI et al., 2006). Nessa linha de investigação, convém mencionar o estudo de Tsurutani et al. (2006) onde pesquisaram a relação da proteína Akt1 fosforilada como fator prognóstico em adenocarcinoma e em carcinomas de células escamosas de pulmão (NSCLC-do inglês Non-Small Cell Lung Cancer Cells), através de imunoistoquímica e *immunoblotting*. Os resultados mostraram que ativação de pAkt, em ambos os resíduos S473 e T308, é um fator relacionado a um pobre prognóstico em todos os estádios das neoplasias investigadas.

Resultado semelhante foi obtido por Tang et al. (2005), ao compararem, através de imunoistoquímica, a expressão de pAkt e PTEN com os dados clínicos de 102 pacientes com NSCL. Os autores observaram que a sobre-expressão de p-Akt e a perda da expressão da proteína PTEN estão correlacionadas a uma pobre diferenciação, envolvimento de linfonodos, metástases à distância e estadiamentos adiantados. Finalmente, os autores mostraram que pacientes com expressão positiva de pAkt e negativa de PTEN apresentam padrões de sobrevida piores do que aqueles que apresentaram expressão negativa de pAkt e positiva de PTEN.

Ainda sob a luz desse tema, Brognard et al. (2001) avaliaram o papel da proteína Akt1, Akt2 e Akt3 na aquisição de resistência a quimioterápicos e à irradiação em linhagens de células de NSCLC. Os autores observaram, através de *immunoblotting*, RT-PCR e de citometria de fluxo, um aumento de apoptose, após utilização de quimioterápicos e de irradiação, associada à inativação da proteína Akt por duas substâncias inibidoras de PI3K (LY294002 e Wortmannin).

A localização nuclear do pAkt foi associada com metástase nodal em uma pesquisa conduzida por Shah et al. (2005). Nesse estudo, os autores examinaram 82 amostras congeladas e emblocadas em parafina de NSCLC e a análise foi realizada através de *western blot* e imunoistoquímica. Shah et al. (2005), entretanto, não conseguiram estabelecer relação de pAkt com a sobrevida nesses pacientes.

Outro estudo relacionando carcinomas de pulmão com o papel de pAkt (fosforilado no resíduo serina 473) na sobrevida foi conduzido por David et al. (2004). Esses pesquisadores acompanharam 61 pacientes com NSCLC, durante 10 anos ou até a morte, e investigaram, através de imunoistoquímica, as proteínas pAkt, p53 e Ki67. Os autores concluíram que pAkt é um independente fator de pobre prognóstico.

Blackhall et al. (2003) verificaram a relação da expressão da proteína Akt (contra ser 473) e do seu receptor tirosinoquinase denominado kit com os dados clínicos e como fator prognóstico em SCLC (do inglês small cell lung cancer), através de imunoistoquímica. Os autores concluíram que a proteína pAkt e o receptor Kit são expressos em altos níveis em SCLC, porém, somente houve associação estatisticamente significativa, em relação à sobrevida, nos 42 pacientes examinados, com o receptor tirosinoquinase examinado.

Inúmeros estudos também relacionaram a participação da proteína Akt em carcinomas de próstata. Hu et al. (2005) ao pesquisarem a relação das caspases com a proteína pAkt (serina 473), avaliada através do método ELISA e *western blot*, em linhagens celulares de carcinomas de próstata, sob ação da substância MSeA (do inglês methylseleninic acid), concluíram que esta substância promove um efeito apoptótico nas células neoplásicas através do bloqueio da via PI3K/Akt. Os autores inferiram que a supressão da atividade da proteína pAkt pelo metilselenol provoca apoptose tanto pela via intrínseca como pela via extrínseca de ativação das caspases.

A perda da expressão da proteína PTEN e níveis altos de Akt fosforilado (Serina 473) foram demonstrados por Malik et al. (2002), através de imunoistoquímica, em 74 carcinomas de próstata analisados. Esses pesquisadores observaram que 92% dos adenocarcinomas pobremente diferenciados apresentaram-se fortemente marcados, em nível de membrana plasmática, para a proteína pAkt, concluindo que a progressão do carcinoma de próstata é acompanhada pelo aumento dos níveis da proteína Akt fosforilada. Finalmente, esses pesquisadores relataram que a proteína fosforilada Akt e a proteína fosforilada

Bad encontravam-se imunomarcadas nessas neoplasias sugerindo que um dos alvos, para prevenir apoptose em carcinomas de próstata, é a proteína Bad.

Nakatani et al. (1999) investigaram a associação dos níveis da proteína Akt1, Akt2 e Akt3 em linhagens celulares de carcinomas de próstata sensíveis e insensíveis ao hormônio andrógeno, e em linhagens de carcinomas de mama sensíveis e insensíveis ao hormônio estrogênio, através de RT-PCR, *western blot* e *northern blots*. Os autores concluíram que a quantidade de Akt3 foi aproximadamente de 20 a 60 vezes maior nos carcinomas de mama e próstata insensíveis aos hormônios do que em neoplasias de mama e próstata sensíveis. Os níveis de Akt1 e Akt2 não mostraram diferenças nessas linhagens celulares estudadas. Os pesquisadores afirmaram que Akt3 pode contribuir para um fenótipo clínico mais agressivo dos carcinomas de mama e próstata que são insensíveis aos hormônios.

Um grande número de pesquisas descritas na literatura mostra a participação da proteína Akt na carcinogênese de mama (CLARK et al., 2002; PANIGRAHI et al., 2004; SCHMITZ et al., 2006; VESTEY et al., 2005; ZHANG et al., 2005). Zhou et al. (2001) ao utilizarem, em cultura de células neoplásicas de mama, agentes que ocasionavam danos ao DNA (etoposide e doxorubicin), observaram que a linhagem de células que apresentava um gene Akt mutante, o qual produzia uma proteína Akt não funcional, sofria mais apoptose e, portanto, maior redução do crescimento, do que as células que não apresentavam a referida mutação. Neste mesmo estudo, os autores, após inocularem as células neoplásicas em camundongos e gerar neoplasias em mama, observaram que somente aquelas neoplasias que apresentavam a via do Akt inativada eram sensíveis ao quimioterápico testado (etoposide). Os autores atestaram, ainda, que a sensibilidade ao quimioterápico

aplicado nos camundongos ocorreu em função do aumento da apoptose sofrida pelas células que apresentavam a via do Akt bloqueada.

Para avaliar o papel da via PI3K/Akt na sobrevida e na resistência a quimioterápicos em carcinomas de mama, Clark et al. (2002) analisaram, através de *western blot* e de citometria de fluxo, seis linhagens celulares de carcinomas de mama, com graus variados de atividade de receptores erbB2 e de receptores de estrógenos. Foi avaliada a atividade de pAkt na presença dos quimioterápicos Trastuzumab, Doxorubicina e de Tamoxifeno, assim como na presença de LY294002, um conhecido inibidor de ativação de Akt. Os resultados mostraram que a ação de Akt é responsável por aumentar a sobrevida e promover a resistência aos quimioterápicos testados nas linhagens celulares de carcinomas de mama avaliadas.

Schmitz et al. (2006) pesquisaram, através de imunoistoquímica em 121 casos de carcinomas de mama, a relação da expressão da proteína MDM2 fosforilada em serina 166 com a ativação de Akt (serina 473) para determinar a relevância de pMDM2 como fator prognóstico em carcinomas de mama nódulo-negativos. Os pesquisadores encontraram resultados estatisticamente significantes na associação de neoplasias com prognósticos desfavoráveis que apresentavam o imunofenótipo pMDM2+/pAkt+.

Outro estudo, conduzido por Panigrahi et al. (2004) não encontrou associação da sobrevida com a imunoexpressão de PTEN (670 casos) e Akt (serina 473), em 691 carcinomas de mama analisados através imunoistoquímica. Vestey et al. (2005) analisaram a expressão imunoistoquímica das três isoformas de pAkt em 97 pacientes, juntamente com a expressão de p53/Hdm2. Os resultados mostraram que pAkt não se correlacionou com a expressão do receptor HER-2, porém correlacionou-se com o aumento citoplasmático de p53. A expressão da proteína

pAkt também se associou com reduzida sobrevida. Nesse contexto, Vestey et al. (2005) inferiram que os níveis de expressão da proteína pAkt está relacionado com o desenvolvimento de carcinomas ductais de mama através de inativação de p53.

Kanamori et al. (2001) confirmaram, através de imunoistoquímica e *western blot*, a inversa correlação da proteína PTEN com a via PI3K/Akt (serina 473) em carcinomas do endométrio. O estudo foi realizado em 103 pacientes. A pesquisa sugeriu, também, que a proteína Bad pode ser um dos alvos da proteína pAkt, uma vez que a expressão da proteína Bad fosforilada foi maior nos casos que não apresentaram imunomarcacão para a proteína PTEN.

Outro estudo em carcinoma de endométrio foi conduzido por Terakawa, Kanamori e Yoshida (2003). Os autores investigaram, através de imunoistoquímica (cortes em parafina) e de *western blot* (amostras congeladas), a relação da expressão da proteína PTEN e da proteína pAkt com a sobrevida, em 98 pacientes com carcinoma do endométrio em estádios avançados. Os resultados mostraram que perda da expressão de PTEN e posterior fosforilação de Akt é um fator prognóstico desfavorável em carcinomas de endométrio.

A atividade da proteína pAkt no prognóstico de carcinomas de ovário, também, está amplamente divulgada na literatura. Delord et al. (2005) mostraram que a quimioterapia com Trastuzumab, a qual atinge receptores HER2, pode promover a cura, em estádios precoces da doença, através da inibição da atividade da proteína pAkt. O estudo foi realizado em modelos utilizando camundongos com micrometástases de carcinoma de ovário e em culturas de células de carcinomas de ovário. A análise foi realizada através de citometria de fluxo, *western blot* e imunoistoquímica.

Outra pesquisa conduzida por Arboleda et al. (2003) ratificou a participação da proteína pAkt2 no comportamento dos carcinomas de ovário. Esses autores transfectaram cDNA da proteína Akt2 em cultura de células de carcinomas de ovário e observaram aumento da capacidade da adesão, motilidade e invasão das células que sofreram transfecção.

A participação da proteína pAkt como bloqueadora da atividade apoptótica celular está bem firmada na literatura. Nesse sentido, convém mencionar a pesquisa de Hah et al. (2003) na qual após estudo em células de leucemia mielóide, tratadas com PMA (do inglês Phorbol 12-myristate 13-acetate), sugeriram que a resistência a apoptose induzida pela proteína PMA, nessas linhagens celulares neoplásicas, está relacionada a defeitos na ativação de caspase 3, supressão da liberação do citocromo c e a persistente ativação da proteína pAkt.

Ao analisar a ação da substância indutora de apoptose TRAIL/Apo2L em linhagens de células de gliomas, através de citometria de fluxo e *western blot*, Puduvalli et al. (2005) demonstraram que esse produto induziu clivagem da proteína Akt1, desse modo, neutralizando os efeitos anti-apoptóticos de pAkt1.

Chadha et al. (2006) comprovaram que a proteína Akt fosforilada possui implicações prognósticas em carcinomas pancreáticos, após analisarem 39 casos através de estudo imunoistoquímico. Altos níveis da proteína Akt fosforilada, inesperadamente, foram associados a um melhor prognóstico.

O significado prognóstico da expressão de pAkt (serina 473) em melanomas foi avaliado por Daí, Marinka e Gang (2005). Utilizando *microarray* e imunoistoquímica, esses autores inferiram que a expressão de pAkt pode servir como um marcador independente de prognóstico em melanomas.

Finalmente, alguns estudos têm sido conduzidos mostrando a ação da proteína pAkt em carcinomas localizados na região de cabeça e pescoço. Nessa linha de abordagem, um estudo conduzido por Gupta et al. (2002) sugeriu a participação do receptor EGF e da ativação da via PI3K/Akt (serina 473) na radioresistência e no controle local de carcinomas de cabeça e pescoço. Os autores relataram que a fosforilação de Akt, via PI3K, pode ser usada como um marcador prognóstico para resposta a radioterapia. Nessa pesquisa, foram avaliados 38 carcinomas epidermóides em relação a imunomarcação de pAkt e EGFR e os resultados foram relacionados com os dados clínicos.

Lim et al. (2005) conduziram um estudo para investigar a associação entre a expressão de pAkt e fatores clínicos e histopatológicos para verificar se pAkt poderia ser utilizado como marcador prognóstico em carcinomas epidermóides bucais. Os pesquisadores analisaram imunoistoquimicamente a expressão de pAkt em 84 casos de carcinomas epidermóides de boca. O estudo revelou que ativação de pAkt é um significativo indicador prognóstico.

2.3 NF- κ B

O fator nuclear κ B (NF- κ B) foi descoberto por Baltimore e colaboradores em 1986 como um fator de transcrição no núcleo de células B, relacionando-se com o aumento da produção da cadeia kappa de imunoglobulina (AGGARWAL, 2004). NF- κ B compreende um conjunto de fatores de transcrição envolvido na promoção da expressão de mais de 150 genes envolvidos em uma ampla variedade de processos

biológicos: resposta imune, inflamação, reabsorção óssea, oncogenese, diabetes, doenças do coração e doença de Alzheimer.

Dentre os genes regulados por NF- κ B estão aqueles que codificam citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, ciclooxigenase sintetase e óxido nítrico sintetase. NF- κ B não é encontrada constitutivamente ativa em células normais, exceto em células T proliferantes, células B, monócitos e astrócitos (AGGARWAL, 2004; CAO; KARIN, 2003; KUMAR et al., 2004; MOYNAGH, 2005; PERKINS, 2004; SAKURAI et al., 1999; YAMAMOTTO; GAYNOR, 2004).

A família NF- κ B é composta de cinco genes: p50, p52, c-Rel, RelB e RelA (p65). As proteínas NF- κ B são conservadas de *Drosophila melanogaster* a humanos e relacionadas através de um domínio N-terminal, chamado RH (do inglês rel homology). O domínio RH medeia suas dimerizações, interação com inibidores específicos, translocação para o núcleo e ligação ao DNA (AGGARWAL, 2004; CAO; KARIN, 2003; DOLCET et al., 2005; KUMAR et al., 2004; LI; STARK, 2002; MOYNAGH, 2005; SUH; RABSON, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004; ZHOU et al., 2005a).

A família de proteínas NF- κ B consiste de cinco proteínas estruturalmente relacionadas e funcionalmente conservadas: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) e NF- κ B2 (p52/p100) (CAO; KARIN, 2003; SUH; RABSON, 2004; ZHOU et al., 2005a). As proteínas NF- κ B podem ser agrupadas em dois grandes grupos: o primeiro grupo composto pelas proteínas p105 e p100. Ambos possuem um domínio C-terminal que contem múltiplas cópias repetidas de anquirinas, o qual atua reprimindo a atividade dessas moléculas. Membros desse grupo não funcionam como fatores de transcrição, sendo sintetizados na forma de precursores inativos (CAO; KARIN, 2003; LI; STARK, 2002; SUH; RABSON, 2004). Quando os

segmentos contendo anquirinas são alvo de proteólise, dependente de ubiquitinação no proteossomo, ocorre a remoção do domínio C-terminal e a transformação da proteína p105 em p50 e da proteína p100 em p52, gerando proteínas maduras, o que equivale dizer com capacidade transcricional (AGGARWAL, 2004; CAO; KARIN, 2003; DOLCET et al., 2005; HACKER; KARIN, 2002; MOYNAGH, 2005; PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

O segundo grupo de proteínas NF- κ B inclui p65 (RelA), Rel (c-Rel), RelB. As proteínas do segundo grupo NF- κ B, diferente das proteínas do primeiro grupo, além do domínio RH, possuem um ou mais domínios TAD (do inglês transcricional activation domains) na região C terminal. Os domínios TAD promovem transcrição por facilitar o recrutamento de co-ativadores e deslocamento de repressores (HACKER; KARIN, 2002; HAYDEN; GHOSH, 2004; LI; STARK, 2002; MOYNAGH, 2005; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

As proteínas da família NF- κ B formam homo e heterodímeros, nos quais as formas ativas mais comuns são p50/RelA ou p52/RelA. Outros exemplos de homo e heterodímeros possíveis incluem: proteína p65/p50, RelB/p100, p52/p50, c-Rel com p50 e p65, p65/p65, p65/p50, p65/p52, p52/c-Rel, p50/c-Rel, p65/c-rel, RelB/p50, RelB/p52, c-rel/c-rel (HAYDEN; GHOSH, 2004; LI; STARK, 2002).

Convencionou-se chamar as formas p105/p50 de NF- κ B1 e a apresentação sob a forma p52/p100 de NF- κ B2 (AGGARWAL, 2004; HAYDEN; GHOSH, 2004; MOYNAGH, 2005; RAVI; BEDI, 2004). NF- κ B foi originalmente relacionado ao heterodímero p50-p65 (CAO; KARIN, 2003; KUMAR et al., 2004; LI; STARK, 2002; MOYNAGH, 2005). A forma mais abundante intracelular de NF κ B encontrada sob a forma do heterodímero p50/p65 (ZHOU et al., 2005b).

Em células não estimuladas, as proteínas da família NF- κ B existem como heterodímeros ou homodímeros seqüestradas no citoplasma em função da associação não covalente com membros a família de proteínas inibitórias I κ B (DOLCET et al., 2005; KUMAR et al., 2004; LI; STARK, 2002; MOYNAGH, 2005; SCHUCHMANN; GALLE; 2002; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004). As proteínas que compõem a família dos fatores de transcrição NF- κ B são ativadas por uma grande variedade de estímulos dentre os quais incluem: danos ao DNA, citocinas, estresse físico e radicais livres. Tais estímulos permitem a translocação de NF- κ B usualmente dentro de 15 minutos (PAPOULI; DEFAIS; LARMINAT, 2002).

A família I κ B apresenta sete membros: I κ B α , I κ B β , Bcl-3, I κ B ϵ , I κ B γ e as proteínas precursoras NF- κ B1/p105 NF- κ B2/p100 que possuem de cinco a sete anquirinas nos domínios C-terminal que se ligam ao domínio RH das proteínas NF- κ B, restando, dessa maneira, a proteína NF- κ B no citoplasma (AGGARWAL, 2004; CAO; KARIN, 2003; DOLCET et al., 2005; HACKER; KARIN, 2002; HAYDEN; GHOSH 2004; MOYNAGH, 2005; RAVI; BEDI, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

I κ B α liga-se ao dímero p65/p50 mascarando somente a seqüência de localização nuclear (NSL) de p65, permanecendo a seqüência de localização nuclear de p50 acessível. A presença acessível tanto de NSL em p50 como da seqüência de exportação nuclear em I κ B α , permite uma constante movimentação do complexo I κ B α /NF- κ B entre o núcleo e o citoplasma, embora a localização predominante seja citoplasmática (HAYDEN; GHOSH 2004; SUH; RABSON, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

Moynagh (2005), entretanto, relata que o complexo NF- κ B-I κ B β não realiza movimentação nuclear, porque I κ B β pode mascarar NSL. I κ B ϵ parece regular o

homodímero p65 e o heterodímero cRel:p65. I κ B ϵ possui habilidade de se deslocar do núcleo para o citoplasma, porém menor que I κ B α . I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ contêm domínios regulatórios do tipo N-terminal que são importantes para degradação das proteínas I κ B (HAYDEN; GHOSH 2004; SUH; RABSON, 2004).

O papel desenvolvido por outras proteínas da família I κ B, como da proteína I κ B ζ , não foi ainda completamente demonstrado, já a proteína BCL-3 possui localização predominantemente nuclear e forma complexos com os homodímeros p52 e p50 (DOLCET et al., 2005; MOYNAGH, 2005; SUH; RABSON, 2004).

I κ B α também regula a atividade NF- κ B ao entrar no núcleo onde se liga a subunidade p65 e a conduz para o citoplasma, desse modo reduzindo os níveis de p65 no núcleo e a atividade de NF- κ B (MOYNAGH, 2005).

Sinais extracelulares, incluindo citocinas (TNF α e IL-1), CD40 ligand (CD40L), bactérias (lipopolissacárides-LPS), vírus e agentes que promovam estresse, permitem a ativação de quinases inibidoras de I κ B (IKK), que são capazes de fosforilar dois resíduos específicos de serina (Ser 32 e Ser36) de I κ B α e resíduos Ser19 e Ser23 em I κ B β . Uma vez fosforiladas as proteínas I κ B são reconhecidas por um complexo de ubiquitina ligase SCF contendo β -TrCP ou complexo E3^{I κ B} ubiquitina ligase, permitindo suas ubiquitinações e degradação no proteossomo 26 (CAO; KARIN, 2003; KUMAR et al., 2004; MOYNAGH, 2005; RAVI; BEDI, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004). A destruição de I κ B permite a translocação para o núcleo dos dímeros de NF κ -B e sua posterior ligação ao promotor de genes alvos (CAO; KARIN, 2003; DOLCET et al., 2005; HAYDEN; GHOSH, 2004; LI; STARK, 2002; SCHUCHMANN; GALLE, 2002).

A proteína IKK é um complexo de 700 a 900 kDa composto de três subunidades: as subunidades catalíticas IKK α , também conhecida como IKK1 ou

CHUK, a subunidade IKK β , também chamada de IKK2, e uma terceira subunidade, que possui ação reguladora, chamada de IKK γ ou IKKAP1 ou NEMO (do inglês NF- κ B essential modifier). IKK γ é necessária para conectar o complexo IKK aos ativadores *upstream* (CAO; KARIN, 2003; DOLCET et al., 2005; HAYDEN; GHOSH, 2004; KUMAR et al., 2004; PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004; SUH; RABSON, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004). A região C-terminal da subunidade IKK γ serve como um sítio de ligação de sinais que levam a ativação da proteína IKK e metade da região N-terminal liga-se a IKK β (RAVI; BEDI, 2004).

Ativação do complexo IKK envolve a fosforilação de dois resíduos serina localizados em IKK α (S176 e S180) ou de IKK β (S177 e S181). Duas teorias são sugeridas para ativação do complexo IKK. Um modelo sugere o recrutamento do complexo IKK ao receptor na membrana plasmática resultando em sua autofosforilação e subsequente ativação. Enquanto o outro modelo de ativação relaciona-se com a participação de MAPK3 (do inglês mitogen-activated protein kinase kinase kinase) dentre elas MEKK1 (do inglês mitogen activated protein/ERK kinase kinase), MEKK2, MKK3, TAK1 (do inglês TGF- β activating kinase 1), NIK (do inglês NF κ B inducing kinase) e NAK (do inglês NF κ B activating kinase) (RAVI; BEDI, 2004; SUH; RABSON, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004). Outras kinases como Akt podem ativar o complexo IKK (SUH; RABSON, 2004).

A proteína NIK é capaz de fosforilar e ativar IKK α e IKK β em resposta a ativação de receptores da família TNF. Tem sido exposto que a proteína MEKK3 fosforila IKK β *in vitro* e que essa proteína é indispensável para a montagem do complexo IKK-I κ B α /NF κ B, permitindo a ativação precoce de NF- κ B (HAYDEN; GHOSH, 2004; KUMAR et al., 2004; LI; STARK, 2002; MOYNAGH, 2005).

Outras proteínas citadas na literatura que podem funcionar como quinases de IKKs incluem Tpl2, PCK ζ , PCK λ , Act-1, porém seus mecanismos não estão completamente elucidados. Embora não estejam definidos todos os modos de ativação de IKK, acredita-se que o complexo IKK $\alpha/\beta/\gamma$ é indispensável para ativação de NF- κ B (HAYDEN; GHOSH, 2004).

É oportuno mencionar o que a literatura denomina de via clássica ou canônica de ativação de NF- κ B: dímeros contendo Rel-A ou c-Rel associado a p50 encontram-se inativos no citoplasma por estarem interagindo com as proteínas I κ B, mais comumente I κ B α . Esta via é disparada por citocinas pró-inflamatórias e infecções virais e bacterianas. Após a ativação, a subunidade IKK β é o maior responsável pela fosforilação de I κ B. Após a fosforilação, proteínas I κ B são reconhecidas por β -TrCP, uma subunidade do complexo de ubiquitinização ligase SCF (do inglês Skp-1/ Cul/F Box), e posteriormente sofrem ubiquitinização pelo proteossomo e NF- κ B move-se para o núcleo onde atua como fator transcricional de mais de 180 genes que possuem a sequência motif (GGGRNNYYCC) (CAO; KARIN, 2003; DOLCET et al., 2005; HACKER; KARIN, 2002; MOYNAGH, 2005; SUH; RABSON, 2004; ZHOU et al., 2005b).

Já a via alternativa é ativada por membros da família do fator de necrose tumoral, como BAFF (do inglês B cell activating factor), expressado em macrófagos, células dendríticas e células B e pelo ligante de CD40, encontrado em macrófagos, células dendríticas, células epiteliais, células B e T e finalmente por LT β R, presente em linfócitos T. Os dímeros contendo as subunidades RelB-p52 (precursor RelB-p100) são os alvos principais. Nessa via NIK ativa IKK α que, então, pode fosforilar p100 que, por sua vez, sofre proteólise e transforma-se na forma p52 madura. Então os dímeros se movem para o núcleo, onde podem ativar específicos genes alvos

(CAO; KARIN, 2003; DOLCET et al., 2005; HACKER; KARIN, 2002; MOYNAGH, 2005; RAVI; BEDI, 2004; SUH; RABSON, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

Embora os dímeros que fazem parte da via clássica (RelA-p50, cRel-p50, RelB-p52) sejam os mais comumente produzidos, outros tipos de homodímeros (p50-p50 e p52-p52) e heterodímeros (c-Rel-RelA, c-Rel-c-Rel) também são produzidos e cada dímero de NFκB provavelmente possui uma função regulatória distinta (DOLCET et al., 2005). Ativação diferencial de subunidades de NFκB pode resultar em regulações distintas de genes, através de diferentes ligações com o DNA (PERKINS, 2004).

A proteína IκBα pode ser alvo de degradação, não só pelas proteínas IKKα e IKKβ, como também pela proteína CK2 (do inglês casein kinase II), uma serina-treonina quinase que fosforila IκBα na região C-terminal, local distinto da fosforilação das IKKs que fosforilam na região N-terminal (RAVI; BEDI, 2004). Nesse sentido Suh e Rabson (2004) relataram, em seu estudo de revisão, que IκBα e IκBβ apresentam um domínio C-terminal chamado de PEST (do inglês proline-glutamic acid, serine and threonine-rich) que está envolvido na fosforilação mediada por CK2.

Além do complexo IKKα/β/γ, duas outras quinases, IKKε/IKKi e TBK1/NAK/T2K, foram associadas a ativação de NF-κB. A proteína IKKε/IKKi está envolvida na ativação de células T e a proteína TBK1/NAK/T2K pode estar envolvida na ativação de NF-κB em resposta a PDGF. As evidências na literatura indicam que a atuação dessas duas proteínas, na ativação NF-κB, ocorre independente e abaixo da cascata que leva a degradação de IκB (LI; STARK, 2002).

A atividade de NF-κB é também regulada através de modificações covalentes que recrutam co-ativadores e alteram a habilidade de ligação dos dímeros de NF-κB ao DNA. Estímulos dependentes de fosforilação de p65 foram os primeiros eventos

reguladores reconhecidos após a degradação de I κ B. Tanto p65 como c-Rel possuem um local no resíduo Ser 276 para interação com a proteína PKAc (do inglês c-AMP dependent protein kinase A) (MOYNAGH, 2005; RAVI; BEDI, 2004).

PKA encontra-se associado ao complexo NF κ B-I κ B no citoplasma e a degradação de I κ B ativa PKA que posteriormente fosforila p65 no resíduo Ser 276. A fosforilação de p65 por PKA desempenha uma função dupla: aumenta a eficiência de ligação de p65 ao DNA e possibilita um local adicional de interação para o coativador transcricional CBP/p300. Acetilação de p65 por CBP/300 prolonga a ligação de NF- κ B por prevenir interação com I κ B. Este modelo exige que p65 seja desacetilada por HDAC-3, que interage diretamente com p65, antes da ligação com I κ B e exportação para o citoplasma (HAYDEN; GHOSH, 2004; LI; STARK, 2002; RAVI; BEDI, 2004).

Quando a subunidade p65 não está fosforilada, a região C-terminal da proteína interage com o domínio Rel homólogo, desse modo, mascarando o sítio de ligação ao DNA, assim como a associação com CBP/p300. A fosforilação do resíduo Ser 276 previne esta associação intramolecular e facilita tanto a ligação ao DNA como a atividade transcricional de NF- κ B (HAYDEN; GHOSH, 2004).

Outra proteína implicada na fosforilação de p65 é a quinase CKII (do inglês casein kinase II). A proteína I κ B protege p65 da fosforilação por CKII, que está constitutivamente ativada, porém, sinais que conduzam a degradação de I κ B expõem o local de fosforilação de p65 para CKII. Dessa maneira, pelo menos duas quinases (PKA e CKII) são capazes de fosforilar p65 em diferentes resíduos, aumentando atividade transcricional de NF- κ B (LI; STARK, 2002; MOYNAGH, 2005).

As proteínas quinases MSK1/2 (do inglês mitogen and stress activated protein kinase) também fosforilam Ser 276 de p65 e estimulam atividade transcricional de

NF- κ B. A diferença em relação a PKA está na localização de MSK1/2 que é nuclear. (HAYDEN; GHOSH, 2004; RAVI; BEDI, 2004).

Respostas de NF- κ B individuais dependem de uma onda de ativação e inativação de vários membros da família NF- κ B, em função da seletividade dos complexos IKK para diferentes I κ Bs, assim como pelas diferentes regulações realizadas pela I κ B nos dímeros NF- κ B. As vias mais estudadas relacionadas à ativação de NF- κ B incluem os seguintes receptores: TNFR (receptor relacionado TNF α), EGFR, receptor do fator de crescimento de insulina, TLR/IL1/IL-18 (do inglês Toll-like receptors e Interleucina) e BCR, os dois últimos relacionados com a atuação na resposta imune (DOLCET et al., 2005; HAYDEN; GHOSH, 2004; MOYNAGH, 2005).

Uma vez estimulados esses receptores desencadeiam uma sequência de sinais envolvendo a ativação das IKKs e posterior ubiquitinização do I κ B α . A superfamília de receptores TNF pode mediar carcinogênese através da indução da proliferação, invasão e metástase de células tumorais, sendo o mais potente ativador de NF- κ B consistindo de pelo menos 19 ligantes e 29 receptores e exibem uma grande diversidade tecidual. Através da ativação de NF- κ B, sinalização via TNF regula diretamente a expressão de genes anti-apoptóticos: cIAP1/2 e Bcl-XL (AGGARWAL, 2004; DOLCET et al., 2005; HAYDEN; GHOSH, 2004).

Ativação do complexo IKK mediada por TNF α tem sido extensamente investigada e envolve receptores TNF-R1. Sinalização relacionada aos receptores TNF requer adaptadores intracelulares para posterior ativação de NF- κ B. Antes de agregar proteínas o receptor TNF, uma vez ativado, libera o seu domínio SODD (do inglês silencer of death domain), um inibidor endógenos da atividade de TNF. Após a

liberação de SODD, a proteína TRADD (do inglês TNRF receptor-associated death domain protein) é associada ao receptor TNF (HAYDEN; GHOSH, 2004).

TRADD posteriormente recruta proteínas da família TRAF (do inglês TNF receptor associated factor) composta pelas proteínas TRAF2, TRAF3 e TRAF5. Alguns estudos têm demonstrado que TRAF2 recruta IKK α e IKK β após tratamento com TNF α . TRAF2 também interage com RIP1 (do inglês receptor interacting protein 1). RIP1 pode recrutar IKK ao unir-se à subunidade NEMO, de maneira independente de TRAF2, e após a ligação induzir auto-fosforilação de IKK (YAMAMOTO; GAYNOR, 2004). RIP1 é essencial para ativação de NF- κ B induzida por TNF α , uma vez que recrutamento de IKK por TRAF2 na ausência de RIP1 não é suficiente para ativação de IKK. Por fim, é interessante mencionar que RIP1 pode ser recrutada diretamente por TRADD (HAYDEN; GHOSH, 2004; MOYNAGH, 2005).

NF- κ B é também ativado via receptores EGF (EGFR). EGFR corresponde a uma família de receptores tirosino-quinase que incluem os seguintes componentes: EGFR (ErbB-1, HER), Neu (ErbB-2, HER2), ErbB-3 (HER3) e ErbB-4 (HER4). Expressão aumentada de membros da família EGFR ou HER2/neu tem sido observada em uma proporção de neoplasias humanas e está relacionada com proliferação, adesão, migração, angiogênese, maior número de metástases, resistência a apoptose e pobre prognóstico (AGGARWAL, 2004; CAO; KARIN, 2003; DOLCET et al., 2005; KUMAR et al., 2004; PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004).

2.3.1 NF- κ B e regulação da apoptose

Células neoplásicas, de quase todos os tecidos, podem adquirir a característica de manter a proteína NF- κ B ativa indefinidamente, dada a sua habilidade de possibilitar transformação maligna, além de fornecer um mecanismo pelo qual tais células escapam do sistema imune e tornam-se resistentes a quimioterapia e radioterapia (BUTCHER et al., 2004; RAVI; BEDI, 2004).

Nessa linha de pensamento, convém mencionar que NF- κ B pode regular a expressão de proteínas que regulam a apoptose. Uma dessas proteínas é a FLIP que se mostra semelhante a caspase 8, porém perde sua atividade de protease e compete com essa caspase pelo DISC (Death-Inducing Signaling Complex), inviabilizando apoptose via Fas ligante. Em última análise, FLIP inibe a atividade apoptótica da caspase 8 (PUDUVALLI et al., 2005). Outras proteínas, induzidas por NF- κ B, da cascata de sinalização de TNF- α são as proteínas TRAF2, TRAF1 e TRAF6 que neutralizam a ação apoptótica da caspase 8. Juntas, essas proteínas podem conferir resistência a apoptose (DOLCET et al., 2005; MOYNAGH, 2005; RAVI; BEDI, 2004; SCHUCHMANN; GALLE, 2002).

NF- κ B pode, também, induzir a expressão de inibidores da apoptose (IAPs- do inglês Inhibitors of apoptosis) e de alguns membros da família anti-apoptótica Bcl-2 (do inglês B-cell lymphocyte/leukemia-2). As proteínas cIAP1, cIAP2 e XIAP suprimem apoptose induzida através de inibição direta de caspases 3, 6 e 9 (do inglês cysteine aspartate proteases). NF κ B pode, também, atenuar a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como BAX (BUTCHER et al., 2004; DOLCET et al., 2005;

PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004; SCHUCHMANN; GALLE, 2002; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

Antagonismo das funções de transcrição que ocorre entre p53 e NF- κ B envolve competição com co-ativadores como p300 e CBP (do inglês CREB-binding protein). Além disso, a proteína p53 reprime a expressão de Bcl-3, um co-ativador transcricional da subunidade p52 de NF- κ B, desse modo alterando a forma ativadora p52/Bcl-3, para o complexo repressor p52/HDAC1. Finalmente, ativação de NF- κ B mediada por IKK2 tem mostrado proteger células de apoptose induzida por dano no DNA, através do aumento dos níveis de MDM2 (DOLCET et al., 2005; PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004).

Células NK (do inglês natural killer) e CTLs (do inglês cytotoxic T lymphocytes) induzem apoptose de células neoplásicas através de dois mecanismos: a liberação de granzimas B que induzem clivagem e ativação de caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10 e o segundo mecanismo envolve ligação dos receptores TNF de morte, como TRAIL-R1/R2 e CD45 nas células alvos por ligantes (FasL, Apo2L/TRAIL), expressos por células NK ou CTLs. Tais ligantes e receptores são produzidos por estímulo dependente de INF (do inglês interferon). NF κ B reduz a morte celular induzida por células NK ou CTLs através da estimulação das proteínas antiapoptóticas c-FLIP, Bcl-x_L e IAPS (HAYDEN; GHOSH, 2004; KIM et al., 2003; RAVI; BEDI, 2004; SUH; RABSON, 2004).

Convém relatar que a ativação prolongada de JNK/AP-1, via RTNF α , permite apoptose e indução de NF κ B permite a síntese de certas proteínas que inibem a ativação de JNK/AP1. Um desses fatores ativados por NF- κ B é a proteína GADD45 β que inibe a via de ativação de JNK por bloquear a quinase MKK7. Outra proteína que inibe a ativação de JNK e que é induzida por NF- κ B é a XIAP (do inglês X-

chromosome-linked inhibitor of apoptosis). A proteína XIAP além de bloquear JNK, inibe também muitas caspases pró-apoptóticas (HAYDEN; GHOSH, 2004).

2.3.2 Regulação da proliferação, angiogênese, invasão e metástase

NF- κ B promove progressão do ciclo celular por regular a expressão de vários genes envolvidos na maquinaria do ciclo celular como as ciclinas D1, D2, D3 e E, além de c-myc e c-mycb. Expressão de ciclina D1 induzida por NF- κ B parece ser o elemento chave no desenvolvimento de glândulas mamárias e carcinogênese de mama (AGGARWAL, 2004; DOLCET et al., 2005; KUMAR et al., 2004; RAVI; BEDI, 2004; SUH; RABSON, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

Convém acrescentar que NF- κ B induz a expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1 (do inglês intercellular adhesion molecule), E selectina, ELAM-1 e VCAM-1 (do inglês vascular cell adhesion molecule) e metaloproteinases, como MMP-2 e MMP-9, envolvidas na degradação das proteínas da matriz extracelular e metástase (AGGARWAL, 2004; DOLCET et al., 2005; PERKINS, 2004).

Alguns fatores angiogênicos incluindo VEGF (do inglês vascular endothelial grown factor), MCP-1, IL-8, TNF produzidos por macrófagos e neutrófilos são também dependentes da ativação de NF- κ B, assim como regulação de genes relacionados à vasodilatação, como iNOS (do inglês inducible nitric oxide synthase) (AGGARWAL, 2004; DOLCET et al., 2005; PERKINS, 2004; SUH; RABSON, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

Alguns oncogenes medeiam seus efeitos através da interação com NF- κ B, entre esses podemos citar os oncogenes Ras, c-myc e Pim-2 (AGGARWAL, 2004). Ao lado disso, algumas citocinas reguladas por NF- κ B são fatores de crescimento para células neoplásicas: TNF é um fator de crescimento para linfomas de Hodgkin, linfoma de células T cutâneo e gliomas e IL-6 funciona como fator de crescimento para mieloma múltiplo. Além disso, EGF, um fator de crescimento para neoplasias de mama e próstata, medeia seus efeitos, em parte, através da ativação de NF- κ B (AGGARWAL, 2004).

O óxido nítrico, que influencia na habilidade do tumor de metastatizar, possui expressão dependente de NF- κ B (AGGARWAL, 2004). NF- κ B induz a expressão de ciclooxigenase-2 (COX2), cuja expressão é importante para o crescimento neoplásico, como observado em carcinomas de cólon, uma vez que COX-2 induz a expressão de alguns fatores angiogênicos (VEGF, FGF, PDGF, TGF- β) e de seus receptores na superfície das células endoteliais (DOLCET et al., 2005; PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

2.3.3 NF- κ B e neoplasias malignas

Algumas oncoproteínas virais podem interagir com o complexo IKK e ocasionar ativação de NF- κ B. O vírus Epstein Barr, implicado no linfoma de Burkitt e no linfoma de Hodgkin, é capaz de induzir persistente ativação de NF- κ B: as proteínas EBNA-2 (do inglês EBV nuclear antigen-2) e LMP-1 (do inglês latent

membrane protein-1) aumentam a atividade de transcrição de NF- κ B (DOLCET et al., 2005; PERKINS, 2004).

Rearranjos ou deleções de cromossomos afetando o locus NF- κ B2, no cromossomo 10q24, resultam da perda de anquirinas de p100 e geração de proteína p52 constitutivamente ativa. Essa condição tem sido observada em linfomas de células T, linfomas de células B e mieloma múltiplo. Algumas leucemias linfocíticas de células B podem apresentar translocação t (14;19) (q32;q13). Esta translocação resulta no aumento da expressão de Bcl-3 que atua como um co-ativador transcricional dos homodímeros p50 ou p52, permitindo um aumento da atividade de NF- κ B e sobre-expressão de seus alvos como a ciclina D1 (DOLCET et al., 2005).

Mutações que conduzam a perda de função de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, resultando em constitutiva atividade nuclear de NF- κ B são características das células de Reed-Sternberg em linfomas de Hodgkin. Altos níveis de c-Rel têm sido encontrados em linfomas de células B, linfomas de Hodgkin e em linfomas de células B do mediastino (AGGARWAL, 2004). Sobre-expressão de c-Rel, também, foi observada em carcinomas de pulmão e mama, assim como altos níveis de proteínas de genes alvos de NF- κ B: ciclina D1, c-myc e Bcl-XL, IL-6, Bcl-2, VEGF, MMP9 e IL8 (DOLCET et al., 2005; SUH; RABSON, 2004; ZHOU et al., 2005b).

2.3.4 Relação da proteína NF- κ B com a sobrevida e com a resistência às drogas antineoplásicas

Para avaliar a relação da expressão dos níveis da subunidade p65 de NF- κ B com o comportamento maligno e atividade antiapoptótica dos carcinomas epidermóides bucais, Nakayama et al. (2001) analisaram, através de imunoistoquímica, 36 carcinomas epidermóides bucais e 15 casos com displasia epitelial na cavidade bucal. Os autores inferiram que expressão elevada de p65 e IKK α contribuem para o comportamento maligno e para a atividade antiapoptótica, provavelmente via pAkt, em carcinomas epidermóides bucais.

Lee et al. (2005) analisaram a relação da ativação da proteína NF- κ B e Akt com o prognóstico em 290 casos de carcinomas gástricos. Os autores utilizaram as seguintes ferramentas: imunoistoquímica, *western blot* e PCR. As linhagens celulares de carcinomas utilizadas continham Akt constitutivamente ativo ou o repressor de NF- κ B, o I κ B α , mutado. Os resultados indicaram que ativação de NF- κ B, correlacionada com ativação de Akt, estava associada a um pior prognóstico.

Zhou et al. (2005b) quantificaram, em linhagens celulares de carcinoma de mama e em carcinomas primários de mama, pelo método Elisa, a quantidade de p50 e p65 ligadas ao DNA, para avaliar a possibilidade da proteína NF- κ B ativada participar da patogênese de carcinomas de mama que apresentavam o receptor de estrógeno (ER). Os resultados encontrados indicaram que a ligação de p50 ao DNA, em carcinomas ER positivo, correlacionou-se positivamente não só com a presença de carcinomas apresentando ER, como também com alguns aspectos clínicos, entre os quais, os seguintes: recidiva, metástase e tempo livre de doença.

Em seus estudos revisionistas, Suh e Rabson (2004) referiram que as proteínas constitutivamente ativadas NIK, partícipes da via alternativa de ativação de NF- κ B, participam da patogênese dos carcinomas de próstata.

Para avaliar se a localização de NF- κ B em adenocarcinomas de próstata com diferentes estadiamentos histológicos, poderia ser utilizada como fator prognóstico, Lessard et al. (2003) analisaram, através de imunoistoquímica, a sublocalização da subunidade p65 de NF κ B. Os autores concluíram que a localização nuclear de NF κ B pode ser utilizada como fator prognóstico em adenocarcinoma de próstata.

Fradet et al. (2004) analisaram, através de imunoistoquímica, a relação da imunomarcção nuclear de NF- κ B, com a recorrência de adenocarcinomas de próstata. Os autores inferiram que NF- κ B pode servir como um marcador independente de risco de recorrência em adenocarcinomas de próstata.

Outro estudo realizado com a finalidade de verificar a utilização da proteína NF- κ B, como fator prognóstico em adenocarcinomas de próstata, foi conduzido por Ross et al. (2004). A reação de imunoistoquímica foi a técnica utilizada. Os pesquisadores sugeriram, após análise dos resultados, que a proteína NF- κ B pode ser utilizada como fator prognóstico e que estratégias com quimioterápicos que bloqueiem a atividade de NF- κ B seriam úteis para evitar recidivas.

2.4 Metalotioneína

A Metalotioneína corresponde a uma superfamília de proteínas, com 61 aminoácidos em mamíferos, de baixo peso molecular (6000 Da), descoberta em

1957, nos rins de cavalos, ricas em cisteína (1/3 dos aminoácidos presentes) e que possuem a característica de serem ligantes de metais bivalentes (ABDEL-MAGEED; AGRAWAL, 1998; CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; ROMERO-ISART; VASAK, 2002; SATO; KONDOH, 2002; THEOCHARIS et al., 2004). O nome metalotioneína reflete as altas concentrações de tiolato sulfúrico e metal, ambos na ordem de 10%. MTs (metalotioneínas) não são encontradas somente no reino animal, mas também em microorganismos procariotas, assim como em plantas (HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; ROMERO-ISART; VASAK, 2002; VASAK; HASLER, 2000).

A proteína não ligada a metais é denominada de tioneína ou apoproteína, sendo expressa transitoriamente em células não neoplásicas, em condições de deficiência de Zn. Há quatro tipos de metalotioneínas em mamíferos, chamadas de isoformas 1, 2, 3 e 4. As posições das cisteínas são as mesmas nessas isoformas. As MT-1 e MT-2 são expressas em quase todos os órgãos do corpo e células em cultura, e são induzidas por uma grande variedade de agentes indutores de estresse, como metais pesados e agentes oxidativos. As MT-1 e MT-2 apresentam maior expressão no fígado, estando envolvidas na manutenção da homeostasia do Zn. MT-3 é expressa no cérebro e sua ação é de inibição da proliferação neuronal. A MT-4 é expressa especificamente em células epiteliais da língua e da pele e possui a função relacionada à diferenciação de células epiteliais escamosas de epitélios estratificados.

As MT-3 e MT-4 são constitutivamente expressas, já MT-1 e MT-2 tanto se apresentam constitutivamente expressas como podem ser induzidas por vários estímulos (BUTCHER et al., 2004). A maioria dos tecidos dos mamíferos contém níveis baixos de MT, os quais podem variar com o tipo de tecido e com a idade. A MT hepática pode conter principalmente Zn e Cd, especialmente durante o período

pré-natal e durante a gestação, enquanto a MT renal pode conter Cd, Cu e Zn (HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; SATO; KONDOH, 2002; THEOCHARIS et al., 2004; VASAK; HASLER, 2000).

Apesar de muitas décadas de intensas pesquisas, as precisas ações fisiológicas das MTs não têm sido totalmente identificadas. Levando em consideração suas ações de ligantes de metais, funções fisiológicas, tais como transporte e estocagem de íons essenciais (zinco, cobre) e detoxificação de outros íons não essenciais (cádmio, mercúrio), têm sido propostas. Outro modelo sugerido de função das metalotioneínas prega que essas proteínas serviriam de doadoras de Zn para proteínas, modulando a ligação do DNA a fatores de transcrição que apresentem estruturas ditas de dedos de zinco, como Sp1, TFIIA (CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; THEOCHARIS et al., 2004; VASAK; HASLER, 2000). Às proteínas MT-1 e MT-2 têm sido sugerido um papel de chaperonas, fornecendo zinco e cobre, após injúria tecidual, a vários fatores de transcrição, metaloenzimas e fatores de crescimento requeridos para o reparo e rápido crescimento celular. Por outro lado, apo-MT é capaz de terminar, ao remover Zn, a ligação de fatores de transcrição que apresentem dedos de Zn ao DNA (CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; CHERIAN; KANG, 2006; KIM et al., 2003; ROMERO-ISART; VASAK, 2002; SATO; KONDOH, 2002; VASAK; HASLER, 2000).

Outro interessante aspecto da reatividade da família das MTs é sua habilidade em reagir com alguns radicais livres. Nesse sentido, tem sido mostrado que MTs, em função de seu alto teor de cisteína, são eficientes captadoras de espécies reativas do oxigênio, como peróxido de oxigênio (H_2O_2), hidroxilas (OH), superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO), o que, dessa forma protege os tecidos contra

injúrias oxidativas, entre as quais podem ser incluídos: a radiação, a peroxidação lipídica, o estresse oxidativo causado por drogas antineoplásicas e condições de hiperoxidação (CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; KIM et al., 2003; SATO; KONDOH, 2002; THEOCHARIS et al., 2004).

Outras adicionais funções sugeridas incluem adaptação de stress, regulação do crescimento neuronal e efeitos anti-apoptóticos (CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; ROMERO-ISART; VASAK, 2002; SATO; KONDOH, 2002). Os efeitos anti-apoptóticos estão relacionados a uma interação específica com a subunidade p50 de NFκB, sendo que MT pode ser requerida para estabilizar a ligação de NFκB ao DNA, realizando, desse modo, seus efeitos anti-apoptóticos (VASAK; HASLER, 2000).

A abundância de ligantes tiolato cisteína, nas MTs, propicia à proteína uma afinidade para íons metálicos leves. Embora, naturalmente MTs, sejam geralmente isoladas com Zn(II), Cd(II) e Cu(I), um número grande de íons pode se ligar in vitro. Esses incluem Ag(I), Au(I), Bi(III), Co(II), Fe(II), Hg(II), Ni(II), Pt(II) e Tc(IV). A ordem de afinidade de ligação dos íons metálicos aos locais com tiolatos inorgânicos é: Hg(II)>Ag(I)~Cu(I)>Cd(II)>Zn(II) (CHERIAN; KANG, 2006; ROMERO-ISART; VASAK, 2002; SATO; KONDOH, 2002). Nessa linha de pensamento, à MT tem sido atribuído um papel na detoxificação de metais pesados, uma vez que MT possui afinidade menor com metais essenciais, como Zn, e alta com metais pesados tóxicos, como Cd e Hg, como supramencionado (SATO; KONDOH, 2002). Convém mencionar, ainda, que a ligação de metais a MTs pode ser reversível sob condições de oxirredução e pela presença adequada de íons metálicos (ROMERO-ISART; VASAK, 2002). Assim, a liberação de Zn das metalotioneínas, dos grupos cisteínas sulfúricos, pode ocorrer sob condições de oxidação, já condições de redução

conduziriam a ligação do Zn à MT (CHERAN; KANG, 2006; MARET, 2000). Dessa forma, MTs atuam também como um reservatório para aqueles metais, transferindo íons para macromoléculas celulares (THEOCHARIS et al., 2004).

Em humanos, os genes das MTs estão agrupados na região q13 do cromossomo 16 e incluem pelo menos 11 genes MT-1 (MT-1A, -B, -E, -F, -G, H, -I, J, -K, -L e -X), alguns dos quais podem codificar RNAs não funcionais. Os genes MT-1 e MT-2 contêm regiões TATA boxes e iniciadora, necessárias para recrutar o fator de transcrição IID (TFIID), de uma região contendo uma série de elementos regulatórios de metal, chamada MREs (do inglês metal regulatory elements) que são requeridos para indução por metais, além de GRE (do inglês glucocorticoids regulatory elements), para indução de glicocorticosteróides e de uma região chamada ARE (do inglês oxidative agents regulatory elements). É importante salientar que MREs atuam em conjunção com fatores de transcrição dependentes de Zn, ditos MTF-1 (do inglês zinc-responsive transcription factor). Após estresse (hipóxia ou condições oxidativas) ou exposição a metais, MTF-1 transloca-se do citoplasma para o núcleo, onde se liga a MREs. As MT-3 e MT-4 são induzidas por mecanismos diferentes das MT-1 e MT-2, ainda não completamente elucidados. As expressões das MT-1 e MT-2 são induzidas por estresse químico promovido por metais (Zn; Cd, Hg, Cu, Bi e Ni), por citocinas (IL-6, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α), por espécies reativas do oxigênio, glicocorticóides, por estresse físico via fatores de transcrição, assim como por alterações estruturais na cromatina (CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; KIM et al., 2003; SATO; KONDOH, 2002; VASAK; HASLER, 2000).

Metilação do DNA pode reprimir a transcrição das MTs de alguns modos: inibindo a ligação de fatores de transcrição às regiões promotoras, recrutando co-

repressores transcricionais e finalmente alterando a estrutura da cromatina (mediando acesso de ativadores ao DNA) (HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003).

O aspecto característico de todas as metalotioneínas é a ocorrência da sequência tripeptídica Cys-Xaa-Cys, onde Xaa representa um resíduo de aminoácido diferente de Cys (ROMERO-ISART; VASAK, 2002). Cada molécula de MT pode ligar-se a sete moléculas de Zn e Cd em dois domínios distintos, um domínio amino-terminal (grupo α) e outro domínio carboxi-terminal (grupo β). Após quatro moléculas terem sido ligadas por 11 cisteínas no grupo α , três moléculas de metal são capturadas por nove cisteínas no grupo β . Essas observações sugerem diferenças nas funções fisiológicas entre os dois grupos. Os estudos indicam que Zn no grupo β está envolvido na regulação da respiração mitocondrial promovida pela MT (HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; MARET, 2000; SATO; KONDOH, 2002; VASAK; HASLER, 2000).

As MTs contêm de 60 a 68 aminoácidos, dos quais 20 são cisteínas altamente conservadas. A estrutura primária da MT-3 (68 aminoácidos) mostra um novo motif Cys(7)-Pro-Cys(8)-Pro e duas inserções: uma treonina na posição 5 e um ácido hexapeptídeo na posição 53, quando comparada com as clássicas seqüências das MT-1/MT-2 de 61 e 62 aminoácidos respectivamente. A presença dos dois novos e conservados resíduos Pro é importante para a atividade desta MT-3. Na estrutura primária da MT-4 epitelial, uma inserção Glu, também na posição 5, foi encontrada. Já a MT-3 exibe 70% de identidade seqüencial com as isoformas MT1/MT-2 (ROMERO-ISART; VASAK, 2002). A estrutura tridimensional da Cd₅,Zn₂-MT-2 mostra uma proteína monomérica, em forma de halteres, com sete íons metálicos localizados em dois grupos distintos de metal-tiolato: uma distorcida

cadeia com um grupo com três metais, $M3^{II}Cys_9$, localizado no domínio- β N-terminal; um grupo com quatro metais, $M4^{II}Cys_{11}$ no domínio- α C-terminal. Os íons metálicos encontrados são Zn (II) ou Cd (II). Cd₇-MT-1 mostra alta similaridade à Cd₇-MT-2.

A outra metalotioneína que possui a forma estrutural conhecida é a MT-3. Embora a localização dos grupos que contêm os íons metálicos seja desconhecida, sugere-se que o grupo Cu₄ é mais provavelmente localizado no domínio- β N-terminal da proteína, enquanto no domínio- α possui três íons zinco. Enfim, as propriedades estruturais gerais que caracterizam todas as metalotioneínas são a formação de grupos metal-tiolato, ligando os grupos cisteinil tiolato (HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; MARET, 2000; ROMERO-ISART; VASAK, 2002).

A composição de metal das proteínas nativas depende da origem natural e prévia exposição aos metais. As formas induzíveis MT-1 and MT-2 isoladas de um fígado de um adulto e de um feto humano contêm principalmente zinco, já aquelas isoladas de rins de adulto contêm principalmente cádmio, com algum cobre e zinco. No fígado e rins de mamíferos, as isoformas MT-3 e MT-4 contêm zinco e cobre. Enquanto nos mamíferos, as metalotioneínas ligam-se simultaneamente ao zinco, cádmio ou cobre, MTs de leveduras e fungos contêm exclusivamente cobre (ROMERO-ISART; VASAK, 2002).

2.4.1 Funções do Zn reguladas pela metalotioneína

O crescimento e a diferenciação das células eucarióticas são induzidos por hormônios e fatores de crescimento que disparam cascatas de sinalização

intracelulares. Esses elementos incluem receptores de hormônios, segundo mensageiros intracelulares, proteínas quinases, proteínas fosfatases e fatores de transcrição. Em todos os níveis de transdução de sinais celulares, o Zn está envolvido ou como elemento estrutural (mais de mil fatores de transcrição que contêm domínios dedos de Zn), ou como fator regulatório (conduzindo a proteína quinase C para a membrana plasmática). Zinco estimula a atividade do factor de transcrição MTF-1 (do inglês Metal response element-binding transcription factor-1), que controla a transcrição de genes da metalotioneína. Após ligar-se ao Zn, MTF-1 transloca-se do citoplasma para o núcleo, onde se liga à região MRE (do inglês metal response element), no gene promotor da MT, resultando em aumento da transcrição e síntese de tioneína, o qual se liga ao Zn disponível (BEYERSMANN; HAASE, 2001; HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; KIM et al., 2003; MARET, 2000).

A homeostasia do zinco é parcialmente controlada pela MT, a qual tem sido mostrada desempenhando um papel na regulação da proliferação celular. MT está expressa em tecidos que estão em proliferação, como em fígado de ratos, que estão regenerando-se, e em vários tumores. A maneira como o Zn é liberado de seus locais de ligação nas proteínas e é transferido para outro local permanece desconhecida (MARET, 2000; SATO; KONDOH, 2002; VASAK; HASLER, 2000).

Em últimas palavras, Zn serve como um fator sinalizador na regulação da proliferação, diferenciação e morte celular (BEYERSMANN; HAASE, 2001).

2.4.2 Localização da metalotioneína na célula

Precisar a localização da MT na célula é importante para o entendimento de suas funções fisiológicas. A MT é usualmente encontrada no citoplasma e transferida para o núcleo de hepatócitos, após hepatectomia parcial, sugerindo alterações na localização da MT celular dependentes do ciclo celular. A localização nuclear de MT em células, durante a proliferação (na transição da fase G1 para a fase S), durante o processo de diferenciação, ou, ainda, após injúria celular, indica que alta demanda de zinco é necessária para o reparo e síntese de DNA. Tais eventos coincidem com a indução da síntese de MT e seqüestro de Zn, e posterior transferência de Zn para as algumas enzimas (BEYERSMANN; HAASE, 2001; CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; CHERIAN; KANG, 2006; SATO; KONDOH, 2002).

Em pré-adipócitos e em miofibroblastos, a quantidade de MT no núcleo aumenta durante o processo de diferenciação celular. Três diferentes proteínas quinases possuem capacidade de translocar MT do citoplasma para o núcleo, durante a diferenciação celular: MAP quinase, PI3- quinase e P70S6-quinase. Como MT não é fosforilada por proteínas quinases, parece lícito afirmar que mediadores não conhecidos são necessários para translocação nuclear de MT. Altos níveis de Zn nuclear são necessários para as funções nucleares durante as etapas precoces e diferenciação celular (BEYERSMANN; HAASE, 2001).

MT localizada no citoplasma tem um efeito supressor dos danos oxidativos causados por ter-butilhidroperóxido e da citotoxicidade dos metais pesados, já MT localizada no núcleo não mostrou tais efeitos supressores de danos. MT nuclear

também mostrou efeito protetor contra danos no DNA causado por radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio. Há uma correlação entre a malignidade da neoplasia e a quantidade de MT expressa em células neoplásicas, assim como a supressão da apoptose se relaciona com aumento da expressão da MT (BEYERSMANN; HAASE, 2001; SATO; KONDOH, 2002).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Correlacionar os aspectos clínicos com a imunoexpressão das proteínas pAKt, metalotioneína e NFkB em carcinomas epidermóides de boca.

3.2 Avaliar a utilização das proteínas pAKt, metalotioneína e NF-kB, como marcadores prognósticos de carcinomas epidermóides de boca.

3.3 Avaliar as imunoexpressões das proteínas pAkt, NF-kB e metalotioneína entre si.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras dos tecidos

Foi realizada uma análise retrospectiva dos prontuários de 51 pacientes, com carcinoma epidermóide de boca, através da consulta aos arquivos dos Hospitais Ofir Loyola – HOL, situado na região metropolitana de Belém no Estado do Pará e do Hospital Araújo Jorge, situado na região metropolitana de Goiânia. Ambos os hospitais são considerados como Centros de Alta Complexidade em Oncologia (CACON), pelo Instituto Nacional do Câncer – INCA. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da USP, protocolo nº 45/06 de 04 de abril de 2006 (Anexo A).

As variáveis estudadas foram retiradas dos prontuários dos pacientes, os quais foram resumidos em formulários padronizados e arquivados em um banco de dados informatizado no Registro Hospitalar do Câncer – RHC. Foram incluídos no estudo todos os pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide de boca, confirmados através de laudo histopatológico, no período compreendido entre 01 de janeiro de 1997 a 31 de dezembro de 2003. Os pacientes foram acompanhados por período máximo de 60 meses após o diagnóstico inicial.

Os dados clínicos coletados foram: sexo, idade, consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas, localização anatômica da lesão, estadiamento (TNM), tratamento cirúrgico e presença de recidiva (Quadros 4.1 e 4.2). A classificação clínica TNM considera as lesões de acordo com as dimensões do tumor primário (T), o comprometimento de linfonodos regionais (N) e metástase à distância (M), que foi

preconizada pela União UICC (Internacional Contra o Câncer) e pela AJCC (American Joint Committee on Cancer), em 1982 (Quadros 4.3 e 4.4).

PAC	IDADE	SEXO	FUMANTE	ETILISMO	LOCAL	T	N	M	EST	TRAT. CIR.
01	53	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	M. JUGAL	4	0	0	IV	FALSO
02	64	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	LINGUA	3	0	0	III	VERDADEIRO
03	75	FEM	VERDADEIRO	VERDADEIRO	ASSOALHO	4	1	0	IV	FALSO
04	33	MASC	FALSO	FALSO	LÍNGUA	3	0	0	III	VERDADEIRO
05	54	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	LINGUA	1	0	0	I	VERDADEIRO
06	66	FEM	FALSO	FALSO	PALATO	4	1	0	IV	VERDADEIRO
07	56	MASC	FUMANTE	FALSO	LÍNGUA	2	0	0	II	VERDADEIRO
08	52	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	REBORDO	4	0	0	IV	VERDADEIRO
09	74	FEM	VERDADEIRO	VERDADEIRO	REBORDO	4	0	0	IV	VERDADEIRO
10	64	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	ASSOALHO	1	3	0	IV	VERDADEIRO
11	53	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	REBORDO	4	1	0	IV	VERDADEIRO
12	66	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	PALATO	4	0	0	IV	FALSO
13	63	FEM	VERDADEIRO	FALSO	LINGUA	4	1	0	IV	FALSO
14	62	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	REBORDO	4	0	0	IV	VERDADEIRO
15	66	MASC	FALSO	FALSO	LINGUA	3	0	0	III	VERDADEIRO
16	64	FEM	VERDADEIRO	VERDADEIRO	TRIGONO	4	0	0	IV	FALSO
17	60	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	TRIGONO	4	1	0	IV	FALSO
18	69	FEM	FALSO	FALSO	M. JUGAL	3	0	0	III	VERDADEIRO
19	79	FEM	VERDADEIRO	FALSO	REBORDO	4	0	0	IV	FALSO
20	68	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	ASSOALHO	2	0	0	II	VERDADEIRO
21	56	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	ASSOALHO	4	1	0	IV	VERDADEIRO
22	79	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	TRIGONO	2	0	0	II	VERDADEIRO
23	41	MASC	FALSO	FALSO	PALATO	2	2	0	IV	VERDADEIRO
24	75	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	ASSOALHO	3	2	0	IV	FALSO
25	65	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	LINGUA	4	2	0	IV	FALSO
26	43	MASC	FALSO	FALSO	ASSOALHO	4	3	0	IV	VERDAEIRO
27	53	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	LÍNGUA	3	2	0	IV	VERDADEIRO
28	85	FEM	VERDADEIRO	FALSO	LINGUA	3	0	0	III	VERDADEIRO
29	70	FEM	VERDADEIRO	FALSO	LÍNGUA	4	2	0	IV	FALSO
30	45	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	ASSOALHO	2	2	0	IV	VERDADEIRO
31	69	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	LINGUA	3	0	0	III	VERDADEIRO
32	68	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	ASSOALHO	3	0	X	III	FALSO
33	73	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	LÍNGUA	4	2	X	IV	FALSO
34	73	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	LINGUA	2	2	X	IV	FALSO
35	63	FEM	VERDADEIRO	FALSO	LÍNGUA	4	3	0	IV	FALSO
36	60	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	ASSOALHO	2	1	0	III	VERDADEIRO
37	74	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	LINGUA	4	2	0	IV	FALSO
38	84	FEM	VERDADEIRO	FALSO	LINGUA	3	1	0	III	VERDADEIRO
39	27	FEM	FALSO	FALSO	LÍNGUA	2	0	0	II	VERDADEIRO
40	74	FEM	VERDADEIRO	VERDADEIRO	LÍNGUA	3	2	X	IV	VERDADEIRO
41	71	MASC	VERDADEIRO	FALSO	LÍNGUA	3	3	0	IV	FALSO
42	65	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	LÍNGUA	3	0	0	III	VERDADEIRO
43	59	MASC	FALSO	FALSO	LINGUA	3	2	0	IV	VERDADEIRO
44	67	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	ASSOALHO	3	2	1	IV	FALSO
45	71	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	LINGUA	2	0	0	II	VERDADEIRO
46	60	MASC	VERDADEIRO	VERDADEIRO	ASSOALHO	4	2	0	IV	FALSO
47	25	MASC	FALSO	FALSO	LINGUA	4	1	0	IV	FALSO
48	93	FEM	VERDADEIRO	FALSO	LINGUA	3	1	0	III	FALSO
49	43	FEM	VERDADEIRO	VERDADEIRO	ASSOALHO	4	2	0	IV	VERDADEIRO
50	72	MASC	VERDADEIRO	FALSO	LINGUA	4	1	0	IV	FALSO
51	39	MASC	VERDADEIRO	FALSO	LINGUA	4	3	0	IV	FALSO

Quadro 4.1 – Dados clínicos coletados

PACIENTE	HOUE RECIDIVA	APÓS O TRAT.	DATA TRAT.	ÓBITO/ ÚLT.CONS.
01	FALSO	OBITO	2/11/1999	02/08/2000
02	FALSO	OBITO	2/07/1999	18/11/1999
03	FALSO	ACOMPANHAMENTO	21/06/2001	31/08/2006
04	VERDADEIRO	ACOMPANHAMENTO	3/01/2002	13/02/2007
05	FALSO	OBITO	3/10/2002	24/06/2005
06	FALSO	ACOMPANHAMENTO	19/03/2002	11/06/2007
07	VERDADEIRO	ACOMPANHAMENTO	10/06/1997	12/07/2001
08	FALSO	OBITO	19/03/2004	30/06/2007
09	FALSO	ACOMPANHAMENTO	6/11/2003	22/08/2007
10	FALSO	ACOMPANHAMENTO	8/04/2003	22/08/2007
11	FALSO	OBITO	18/11/2003	23/01/2003
12	FALSO	OBITO	5/03/2004	09/03/2004
13	FALSO	OBITO	21/01/2004	28/02/2004
14	FALSO	OBITO	6/06/2003	10/09/2003
15	VERDADEIRO	OBITO	10/03/2003	24/01/2004
16	FALSO	OBITO	15/05/2000	17/07/2001
17	VERDADEIRO	OBITO	31/01/2001	01/06/2002
18	FALSO	OBITO	28/07/1998	04/05/2004
19	FALSO	OBITO	14/03/2002	29/11/2002
20	VERDADEIRO	OBITO	20/05/1999	20/04/2003
21	FALSO	OBITO	09/03/2000	19/06/2000
22	FALSO	OBITO	18/09/2001	10/01/2002
23	VERDADEIRO	OBITO	14/07/2004	15/05/2006
24	FALSO	ÓBITO	9/04/2002	30/09/2002
25	VERDADEIRO	ACOMPANHAMENTO	14/11/2002	30/06/2004
26	FALSO	ÓBITO	28/05/2002	12/07/2002
27	FALSO	ÓBITO	8/10/2002	29/04/2003
28	FALSO	ACOMPANHAMENTO	4/11/2002	11/04/006
29	FALSO	ÓBITO	5/07/2002	05/12/2002
30	FALSO	ÓBITO	2/03/2002	03/12/2005
31	FALSO	ÓBITO	31/10/2002	12/09/2004
32	FALSO	ÓBITO	4/11/1998	24/11/1998
33	FALSO	ÓBITO	16/06/2002	13/08/2003
34	FALSO	ÓBITO	19/11/1999	08/09/2000
35	FALSO	ACOMPANHAMENTO	17/12/2001	10/11/2006
36	FALSO	ÓBITO	29/07/2002	02/09/2002
37	VERDADEIRO	ÓBITO	20/08/2002	22/07/2003
38	FALSO	ÓBITO	26/09/2001	15/02/2002
39	FALSO	ACOMPANHAMENTO	7/02/2002	31/01/2007
40	FALSO	OBITO	9/11/1998	11/12/1998
41	FALSO	OBITO	18/06/1998	17/08/1998
42	FALSO	ACOMPANHAMENTO	25/06/2002	23/12/2005
43	FALSO	ÓBITO	30/11/1998	05/03/1999
44	FALSO	ÓBITO	25/03/2002	17/06/2002
45	FALSO	ACOMPANHAMENTO	2/09/2002	21/02/2007
46	FALSO	ÓBITO	30/07/2001	02/10/2001
47	FALSO	OBITO	16/11/2000	09/11/2001
48	FALSO	OBITO	16/03/2000	19/08/2000
49	FALSO	ACOMPANHAMENTO	18/02/2002	26/11/2006
50	FALSO	OBITO	12/06/1999	10/02/2000
51	FALSO	OBITO	13/11/2003	18/12/2003

Quadro 4.2 – Dados clínicos coletados

Tumor Primário (T)	Envolvimento nodal (N)	Metástase a distância (M)
Tx Tumor primário não pode ser avaliado.	Nx Linfonodos regionais não podem ser avaliados.	Mx Metástase a distância não pode ser avaliada
T0 Não há evidência de tumor primário	N0 Ausência de metástases regionais.	M0 Ausência de metástase a distância.
Tis Carcinoma <i>in situ</i>	N1 Metástase em linfonodo ipsilateral único, menor ou igual a 3 cm, em seu maior diâmetro	M1 Presença de metástase a distância.
T1 Tumor de até 2 cm, em seu maior diâmetro	N2a Metástase em linfonodo ipsilateral único, maior que 3 cm, mas menor que 6 cm, em seu maior diâmetro.	
T2 Tumor maior que 2 cm, mas menor que 4 cm, em seu maior diâmetro	N2b Metástase em linfonodos ipsilaterais múltiplos, nenhum maior que 6, em seu maior diâmetro.	
T3 Tumor maior que 4 cm, em seu maior diâmetro	N2c Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum maior que 6 cm, em seu maior diâmetro.	
T4 Tumor maior que 4 cm, com invasão de estruturas adjacentes	N3 Metástase em linfonodos maior que 6 cm, em seu maior diâmetro.	

Quadro 4.3 – Classificação clínica TNM

ESTADIAMENTO TNM			
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
IV A	T4	N0	M0
	qualquer T	N2	M0
IV B	qualquer T	N3	M0
IV C	qualquer T	qualquer N	M1

Quadro 4.4 – Estadiamento TNM

4.2 Técnica de imunoistoquímica

Foram selecionadas 51 amostras emblocadas em parafina provenientes do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital Ofir Loyola e do Hospital Antônio Jorge. As reações foram realizadas no laboratório de imunoistoquímica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, e a padronização para utilização de cada um dos anticorpos utilizados foi determinada no próprio laboratório da disciplina.

As reações foram desenvolvidas em cortes histológicos de 3 μ m de espessura, estendidos em lâminas de vidro, previamente lavadas em etanol absoluto, secas e mergulhadas por cinco minutos em solução de 3-aminopropyltriethoxy-silano a 10% (Sigma Chemical, St. Louis, USA) diluída em etanol absoluto.

Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol, o primeiro por 30 minutos, em estufa a 60°C e o segundo por 20 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram reidratados em banhos descendentes, com passagem em etanol absoluto por três vezes, etanol 95% e etanol 85%, por cinco minutos cada. Posteriormente, para remoção do pigmento formólico, os cortes foram imersos por dez minutos, em solução de hidróxido de amônio a 10%, em etanol a 95%.

Após lavagem em água corrente por 10 minutos, seguida por banhos em água destilada, as lâminas receberam tratamento para recuperação antigênica. Para a recuperação antigênica, as lâminas, que receberam os anticorpos anti-metalotioneína e antiNF-kB foram mergulhadas em solução contendo 1,21 g de Tris, 0,3722 de EDTA e 500 microlitros de Tween, com pH 9,0, e levadas por 15 minutos em microondas potência máxima. As lâminas que receberam o anticorpo antiAkt 1-2-3 foram mergulhadas em solução de ácido cítrico monoidratado 10mM, pH 6 e

colocadas em banho maria por 30 minutos a 95°C. Posteriormente, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos, com duas passagens subseqüentes em água destilada.

Posteriormente, para a inibição da peroxidase endógena, os cortes passaram por dois banhos de 15 minutos em peróxido de hidrogênio 6% em metanol (1:1, v/v). Novamente, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos e, posteriormente, imersos em três banhos de solução de Tris pH 7,4, por cinco minutos cada.

As lâminas, contendo os cortes, foram submetidas à incubação, com o anticorpo primário diluído em solução de BSA (mistura da solução A contendo água destilada e albumina, com a solução B contendo água destilada e azida sódica). Para a identificação da proteína pAkt, foi utilizado o anticorpo monoclonal obtido de coelho antiAkt 1/2/3 (Thr 308)-R: sc-16646-R (Santa Cruz Biotechnololy), sob diluição 1/50 por 60 minutos de incubação. Para identificação da proteína metalotioneína foi utilizado o anticorpo monoclonal antimetalotioneína obtido de camundongo (DAKO- Corporation, Glostrup, Denmark) clone E9, subtipos MT1 e MT2, sob diluição 1/800, por 60 minutos de incubação. Para a identificação da proteína NF-κB, foi utilizado o anticorpo obtido em coelho antiNF-κB (p65) (Zymed Laboratories), sob diluição 1/600 por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e em solução tampão de TRIS pH 7,4. O kit LSAB peroxidase K0690 (DAKO Corporation) foi utilizado como soro secundário e complexo terciário por 30 minutos cada. Posteriormente as lâminas foram lavadas em TRIS pH 7,4 dois banhos de cinco minutos.

A revelação da reação foi feita através da imersão das lâminas em solução do cromógeno diaminobenzidina (DAB, 3,3 – diaminobenzidina, Sigma Chemical CO.,

St Louis, MO/USA) por dez minutos. Os cortes foram, então, lavados em água corrente e contracolorados com hematoxilina de Mayer por dez minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos.

As lâminas sofreram, finalmente, as etapas de desidratação em cadeia ascendente de etanóis e diafanização em dois banhos de xylol. As lâminas foram montadas em Permount (Fisher Scientific, Fair Law, NJ/USA) para exame ao microscópio de luz.

Como controle positivo para a proteína metalotioneína, foi utilizado carcinoma de mama, e para pAkt 1/2/3 e NF-kB foram utilizados cortes de adenocarcinoma de próstata. O controle negativo foi obtido com a supressão do anticorpo primário durante a realização da reação.

4.3 Análise da imunomarcação

A reação foi considerada positiva quando houve a presença da coloração castanha, condição caracterizadora da presença do cromógeno DAB, na reação imunoistoquímica, e negativa para as células que não apresentaram marcação castanha. As lâminas foram observadas em microscópio de luz, modelo Olympus CX40, sob um foco fixo e com clareza de campo.

O sistema de contagem usado, nesse estudo, foi empregado anteriormente na literatura (TSURUTANI et al., 2006). A análise da marcação foi baseada na intensidade e na distribuição da marcação. A distribuição de células marcadas foi analisada da seguinte forma: 0 (0%), 1 (1% a 50%), 2 (51% a 100%), A intensidade

da marcação foi avaliada da seguinte maneira: 0 (sem marcação), 1 (leve marcação), 2 (moderada marcação) e 3 (forte marcação). As lâminas foram analisadas por dois observadores independentes e que não conheciam os dados clínicos dos pacientes. Um consenso foi obtido para cada lâmina investigada. O padrão de marcação das biópsias foi definido com a somatória dos valores encontrados na distribuição da imunomarcação com os índices encontrados na intensidade, ficando o registro final (RF) da seguinte forma: RF0, RF2, RF3, RF4 e RF5. Nesse método, os RF0 e RF2 foram considerados como marcação negativa, enquanto os RF3, RF4 e RF5 foram considerados como marcação positiva.

4.4 Análise estatística

A análise estatística teve o objetivo de avaliar os efeitos da presença das proteínas pAKt, Metalotioneina e NF- κ B sobre as características clínicas e histológicas de 51 pacientes portadores de carcinomas epidermóides de boca. Foram aplicados métodos estatísticos descritivos e inferenciais. Para os testes de hipóteses foi prefixado o nível de significância $\alpha = 0.05$ para rejeição da hipótese de nulidade.

A análise univariada da distribuição do tempo de sobrevida foi realizada pelo Logrank test. As curvas de distribuição da sobrevida foram estimadas pelo diagrama de Kaplan-Meier. As variáveis consideradas significantes na análise univariada (p -valor < 0.05) foram selecionadas para o modelo de análise multivariada, o método

Cox de risco proporcional testou a influência das covariáveis sobre o tempo de sobrevivência dos pacientes.

Para avaliar a associação entre a ocorrência das proteínas pAKt, metalotioneína e NF- κ B e o estadiamento e a recidiva foi aplicado um método não-paramétrico, o teste do Qui-Quadrado. A distribuição das proporções de ocorrência da presença das proteínas, ilustrada pelo diagrama Venn, foi testada pelo método do Qui-Quadrado.

A concordância e discordância entre a presença das proteínas no mesmo paciente, portando uma análise de amostras pareadas foi realizada através do método de McNemar.

Todo o processamento estatístico foi realizado sob o suporte computacional do pacote bioestatístico BioEstat versão 4 (AYRES et al., 2008).

5 RESULTADOS

5.1 Imunomarcações das proteínas pAkt, NF-kB e metalotioneína

Concluídas as reações de imunoistoquímica os resultados indicaram imunomarcação positiva para pAkt em 36 amostras (70,58%), para MT em 34 amostras (66,67%) e para NF-kB em 33 amostras (64,70%)(Quadro 5.1).

PACIENTE	pAkt	Metalotioneína	NF-kB
01	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
02	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
03	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
04	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
05	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
06	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
07	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
08	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
09	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
10	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
11	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
12	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
13	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
14	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
15	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
16	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
17	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
18	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
19	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
20	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
21	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
22	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
23	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
24	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
25	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
26	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
27	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
28	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
29	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
30	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
31	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
32	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
33	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
34	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
35	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
36	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
37	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
38	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
39	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
40	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
41	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
42	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
43	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
44	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
45	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
46	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
47	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
48	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
49	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
50	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
51	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO

Quadro 5.1 - Imunomarcações das proteínas pAkt, metalotioneína e NF-kB

5.2 Distribuição da imunoexpressão das proteínas pAkt, NF-kB e metalotioneína

Somente 2% dos casos estudados apresentaram total ausência de marcação para as proteínas avaliadas e 43,1% das amostras demonstraram imunomarcação positiva para as três proteínas simultaneamente, o restante apontou imunomarcação variada (Tabela 5.1 e Gráfico 5.1).

Tabela 5.1 - Distribuição da presença das proteínas

	n	Resultados Positivos
		%
Nenhuma proteína	1	2.0
Só NF-kB	2	3.9
Só pAkt	3	5.9
Só Metalotioneína	3	5.9
pAkt e NF-kB	7	13.7
pAkt e Metalotioneína	4	7.8
NF-kB e Metalotioneína	9	17.6
Três Proteínas	22	43.1
Total	51	100.0

Gráfico 5.1 - Distribuição da presença das proteínas

Como representado no gráfico 5.1 é mais significativa a confluência das proteínas pAkt, NF-kB e MT nos casos de carcinoma epidermóide aqui avaliados.

Gráfico 5.2 - Interação entre as proteínas

Significância estatística da distribuição das proteínas avaliadas pelo Qui-Quadrado de Aderência, com correção de Yates, GL=1.

Tabela 5.2 - Distribuição das proteínas avaliadas pelo Qui-Quadrado de Aderência, com correção de Yates, GL=1.

Proteínas	pAkt	Metalotioneína	NF-kB
pAkt	---	0.6928	0.2334
Metalo	---	---	0.6096
NF-kB	---	---	---

A tabela 5.3 exibe o resultado do Qui-Quadrado de Aderência onde a distribuição das proporções dos testes das três proteínas não apresentou diferença significativa. Somente a relação entre pAkt e metalotioneína foi avaliada como significativamente discordante, sendo esta avaliada pelo teste de McNemar, para amostras pareadas, o qual obteve p-valor < 0.0001.

Tabela 5.3 - Avaliação da discordância na ocorrência de proteínas

* Teste de McNemar

McNemar	pAkt	Metalotioneína	NF-kB
pAkt	---	<0.0001*	0.4807
Metalo		---	0.3036
NF-kB			---

5.3 Análise das variáveis clínicas em função da sobrevida

5.3.1 Variável cirurgia

Para avaliar a sobrevida dos pacientes desse estudo, tendo como base o tratamento cirúrgico realizado, foi aplicado o teste estatístico LogRank. O teste LogRank obteve p-valor = 0.0006, o qual é altamente significativo, portanto podemos concluir que o tempo de sobrevida varia em função da realização da cirurgia.

Observado = 18.0000

Esperado = 26.9330

Variância (VL) = 6.7329

Qui-quadrado (WL) = 11.8521

Graus de liberdade = 1

(p) = 0.0006*

H_0 : O tempo de sobrevida com cirurgia e sem cirurgia é o mesmo.
O tempo de sobrevida dos indivíduos que foram submetidos à cirurgia é diferente dos que foram tratados sem cirurgia.

Nível de decisão: alfa = 0.05

Conclusão: Rejeita-se H_0 .**Gráfico 5.3** - Proporção de sobrevida em função do tipo de terapia, com ou sem cirurgia

5.3.2 Variável Estadiamento

A avaliação da sobrevida partindo-se do parâmetro estadiamento, o teste LogRank obteve p-valor = 0.4859, o qual não é significativo, portanto não temos evidências suficientes para afirmar a existência de associação entre os estádios e o tempo de sobrevida.

Observado = 13.0000
 Esperado = 15.1201
 Variância (VL) = 9.2554
 Qui-quadrado (WL) = 0.4856
 Graus de liberdade = 1
 (p) = 0.4859
 H_0 : O tempo de sobrevida nos estádios I, II e III é o mesmo que no estágio IV.
 H_1 : O tempo de sobrevida nos estádios I, II e III é diferente do estágio IV.
 Nível de decisão: alfa = 0.05

Gráfico 5.4 - Proporção de sobrevida em função do estadiamento

5.3.3 Variável etilismo

O teste LogRank também foi aplicado para interpretar a relação sobrevida – etilismo. O valor final foi de $p = 0.0006$, o qual é altamente significativo, portanto podemos afirmar que existe associação entre o consumo de bebida alcoólica e o tempo de sobrevida. Sendo o etilismo associado à menor sobrevida.

Observado = 18.0000
 Esperado = 26.9330
 Variância (VL) = 6.7329
 Qui-quadrado (WL) = 11.8521
 Graus de liberdade = 1
 (p) = 0.0006*
 H₀: O histórico de consumo de álcool não interfere no tempo de sobrevida dos pacientes.
 H₁: O histórico de consumo de álcool interfere no tempo de sobrevida dos pacientes.
 Nível de decisão: alfa = 0.05

Gráfico 5.5 - Proporção de sobrevida em função do consumo de álcool

5.3.4 Variável idade ≥ 45 anos

O teste LogRank obteve p-valor = 0.2989, o qual não é significativo, portanto não temos evidências suficientes para afirmar que existe associação entre a idade ≥ 45 anos e o tempo de sobrevida.

Observado = 33.0000
 Esperado = 30.4609
 Variância (VL) = 5.9755
 Qui-quadrado (WL) = 1.0789
 Graus de liberdade = 1
 (p) = 0.2989
 H₀: A idade ≥ 45 anos não interfere no tempo de sobrevida.
 H₁: A idade ≥ 45 anos interfere no tempo de sobrevida.
 Nível de decisão: alfa = 0.05

Gráfico 5.6- Proporção de sobrevida em função da idade 45 anos

5.3.5 Variável localização (língua/assoalho)

De acordo com o teste LogRank (p -valor = 0.1352) não temos evidências suficientes para afirmar que existe associação entre a localização da neoplasia e a sobrevida.

Observado = 27.0000
 Esperado = 30.6133
 Variância (VL) = 5.8501
 Qui-quadrado (WL) = 2.2317
 Graus de liberdade = 1
 (p) = 0.1352
 H_0 : A localização da neoplasia (língua/assoalho) não interfere no tempo de sobrevida.
 H_1 : A localização da neoplasia (língua/assoalho) interfere no tempo de sobrevida.
 Nível de decisão: alfa = 0.05

Gráfico 5.7 - Proporção de sobrevida em função da localização da neoplasia

5.3.6 Variável sexo

Nas amostras desse estudo não houve associação entre o tempo de sobrevida e o sexo dos pacientes (LogRank p = 0.7083).

Gráfico 5.8 - Proporção de sobrevida em função do sexo do paciente

Observado = 31.0000
 Esperado = 32.1017
 Variância (VL) = 8.6722
 Qui-quadrado (WL) = 0.1400
 Graus de liberdade = 1
 (p) = 0.7083
 H_0 : Não existe associação entre o sexo do paciente e o tempo de sobrevida.
 H_1 : Existe associação entre o sexo do paciente e o tempo de sobrevida.
 Nível de decisão: alfa = 0.05

5.3.7 Variável tabagismo

Nas 51 amostras deste estudo não houve correlação estatisticamente significativa entre o tabagismo e a sobrevida (LogRank p-valor = 0.3148).

Gráfico 5.9 - Proporção de sobrevida em função do tabagismo

Observado = 32.0000
 Esperado = 29.4198
 Variância (VL) = 6.5877
 Qui-quadrado (WL) = 1.0106
 Graus de liberdade = 1
 (p) = 0.3148
 H_0 : Não Existe associação entre o tabagismo e o tempo de sobrevida.
 H_1 : Existe associação entre o tabagismo e o tempo de sobrevida.
 Nível de decisão: alfa = 0.05

5.4 Análise das proteínas pAkt, NF-kB e metalotioneína em relação à sobrevida

5.4.1 Variável pAkt

Trinta e seis amostras foram consideradas marcação positiva e quinze amostras foram consideradas marcação negativa. A maioria das amostras positivas exibiu marcação nuclear, havendo também marcação simultânea de núcleo e citoplasma (Figuras 5.1 e 5.2).

O teste LogRank obteve p-valor = 0.0298*, o qual é significativo, portanto podemos afirmar que a expressão da proteína pAkt causa impacto no tempo de sobrevida (Gráfico 5.10).

Observado = 25.0000
 Esperado = 30.3134
 Variância (VL) = 5.9795
 Qui-quadrado (WL) = 4.7214
 Graus de liberdade = 1
 (p) = 0.0298*

H_0 : Não existe associação entre a presença da proteína pAkt e o tempo de sobrevida.
 H_1 : Existe associação entre a presença da proteína pAkt e o tempo de sobrevida.

Nível de decisão: alfa = 0.05

Gráfico 5.10 - Proporção de sobrevida em função da presença de pAkt

Figura 5.4.1.1 - Imunoexpressão da proteína pAkt (Streptavidina-biotina 400X).

Figura 5.4.1.2 - Imunoexpressão da proteína pAkt (Streptavidina-biotina 200X).

5.4.2 Variável NF-kB

A proteína NF-kB foi encontrada no citoplasma da maioria das células, porém algumas amostras apresentaram marcação nuclear focal (Figura 5.3). Em alguns campos observou-se marcação citoplasmática e nuclear ocorrendo simultaneamente (Figura 5.4). De acordo com o teste LogRank ($p = 0.1817$) não é possível afirmar influência da proteína NF-kB com o tempo de sobrevida.

Observado = 29.0000
 Esperado = 31.9920
 Variância (VL) = 5.0189
 Qui-quadrado (WL) = 1.7836
 Graus de liberdade = 1
 (p) = 0.1817
 H_0 : Não Existe associação entre presença de NF-kB e o tempo de sobrevida .
 H_1 : Existe associação entre a presença de NF-kB e o tempo de sobrevida .
 Nível de decisão: alfa = 0.05

Gráfico 5.11 - Proporção de sobrevida em função da presença de NF-kB

Figura 5.4.2.1 - Imunoexpressão da proteína NF-kB (Streptavidina-biotina 200X).

Figura 5.4.2.2 - Imunoexpressão da proteína NF-kB (Streptavidina-biotina 400X).

5.4.3 Variável metalotioneína

Imunoreatividade para a proteína MT foi observada tanto no núcleo como no citoplasma e algumas vezes em ambos os compartimentos na mesma célula (Figuras 5.5 e 5.6).

O teste LogRank obteve p-valor = 0.0835, o qual não é significativo, portanto não temos evidências suficientes para afirmar que a presença de metalotioneína altera o tempo de sobrevida.

Observado = 28.0000
 Esperado = 31.8992
 Variância (VL) = 5.0772
 Qui-quadrado (WL) = 2.9945
 Graus de liberdade = 1
 (p) = 0.0835
 H₀: Não Existe associação entre a presença de Metalotioneína e o tempo de sobrevida.
 H₁: Existe associação entre a presença de Metalotioneína e a sobrevida.

Gráfico 5.12 - Proporção de sobrevida em função da presença de metalotioneína

Figura 5.4.3.1 - Imunoexpressão da proteína metalotioneína (Streptavidina-biotina 200X).

Figura 5.4.3.2 - Imunoexpressão da proteína metalotioneína (Streptavidina-biotina 400X).

5.5 Análise da curva de sobrevida

O gráfico 5.13 exibe o tempo de sobrevida em meses dos pacientes pesquisados.

Gráfico 5.13 - Gráfico de Kaplan-Meier da curva de sobrevida geral

A tabela 5.4 apresenta a distribuição da proporção de sobrevida e da taxa de risco em função do tempo (meses). Ela está apresentada no gráfico acima.

Tabela 5.4 - Distribuição da proporção de sobrevida e da taxa de risco em função do tempo

Tempo	Prop. Sobrev.	Tx. Risco.	Risco Acm.
0.1	0.983	0.0175	0.0175
0.2	0.965	0.0179	0.0353
0.7	0.948	0.0183	0.0536
1.1	0.93	0.0188	0.0724
1.2	0.896	0.038	0.1103
1.3	0.878	0.0201	0.1304
1.5	0.86	0.0207	0.1511
2	0.842	0.0213	0.1724
2.1	0.823	0.0222	0.1945
2.8	0.805	0.0228	0.2174
3.2	0.768	0.0464	0.2638
3.4	0.749	0.0249	0.2887
3.8	0.73	0.0255	0.3142
4.6	0.712	0.0259	0.3402
4.7	0.693	0.0263	0.3665
5.1	0.675	0.0269	0.3934
5.2	0.656	0.0277	0.4211
5.8	0.637	0.0294	0.4505
6.8	0.618	0.0312	0.4817
8.1	0.598	0.0331	0.5147
8.7	0.577	0.035	0.5498
9.1	0.556	0.0366	0.5864
9.8	0.535	0.0386	0.625
10.7	0.514	0.04	0.665
11.2	0.493	0.0429	0.7079
11.9	0.469	0.0482	0.7561
14.1	0.445	0.0528	0.8089
14.3	0.421	0.0569	0.8658
16.2	0.395	0.0618	0.9276
22.3	0.367	0.0734	1.0011
22.7	0.34	0.0782	1.0793
33.2	0.313	0.0822	1.1615
39.9	0.287	0.0867	1.2482
45.7	0.259	0.1023	1.3504
47.7	0.228	0.1269	1.4773
70.2	0	7.733	9.2103

5.6 Análise do modelo de risco proporcional de Cox

O modelo de risco proporcional de Cox analisa a influência das variáveis que interferiram na sobrevida (cirurgia, pAkt e consumo de álcool).

O gráfico 5.14 é uma das saídas do *Cox survival hazard*, onde é apresentada a variável cirurgia (p-valor = 0.0223*) a qual é significativa dentro do contexto da análise multivariada onde é considerada a influência das outras duas variáveis que compõe o modelo: alcoolismo e pAkt.

Gráfico 5.14 - Cox survival hazard, variável cirurgia

O gráfico 5.15 é outra das saídas do *Cox survival hazard*, onde é apresentada a variável pAkt (p-valor = 0.0419*) a qual é significativa dentro do contexto da análise multivariada onde é considerada a influência das outras duas variáveis que compõe o modelo: etilismo e cirurgia.

Gráfico 5.15 - Cox survival hazard pAkt

O gráfico, referente ao *Cox survival hazard*, exibe a variável etilismo (p-valor = 0.5655) a qual não é significativa dentro do contexto da análise multivariada onde é considerada a influência das outras duas variáveis que compõe o modelo: pAkt e cirurgia.

Gráfico 5.16 - Cox survival hazard, etilismo

5.7 Variáveis preditoras pelo modelo de Cox

Taxa de risco para o etilismo, cirurgia e pAkt.

Tabela 5.5 - Variáveis preditoras pelo modelo de Cox

	Etilismo	Cirurgia	pAkt
B	0.1986	-0.7883	0.7157
E. Padrão	0.3456	0.3449	0.3517
p-valor	0.5655	0.0223*	0.0419*
Tx. Risco	1.2197	0.4546	2.0455
IC 95% (Tx. Risco)	0.6196 - 2.4013	0.2313 - 0.8937	1.0267 - 4.0755

5.8 Distribuição do tamanho do tumor (T) conforme a presença das proteínas

Foi aplicado o teste U de Mann-Whitney.

O tamanho do tumor (T) não sofre alteração em função da presença de quaisquer das três proteínas, todas as proteínas obtiveram p-valor não significante.

Tabela 5.6 - Distribuição do tamanho do tumor (T) conforme a presença das proteínas

	pAkt	NF-kB	Metalotioneína
	mediana (min, máx)	mediana (min, máx)	mediana (min, máx)
Positivo	4 (1,4)	3.5 (1,4)	4 (1,4)
Negativo	3 (1,4)	4 (1,4)	3 (2,4)
p-valor	0.0862	0.8367	0.4824

5.9 Distribuição da recidiva conforme a presença de pAkt

Não há evidências suficientes para afirmar que a ocorrência de recidiva sofre alguma alteração em função da ocorrência de pAkt (p-valor = 0.6184, Qui-Quadrado de Aderência e p-valor = 1.0000, teste exato de Fisher).

Tabela 5.7 - Distribuição da recidiva conforme a presença de pAkt

Recidiva			Sem Recidiva	
pAkt	n	%	n	%
Positivo	6	75.0	30	69.8
Negativo	2	25.0	13	30.2
Total	8	100	43	100

5.10 Distribuição da recidiva conforme a presença de metalotioneína

Não há evidências suficientes para afirmar que a ocorrência de recidiva sofre alguma alteração em função da ocorrência de metalotioneína (p-valor = 0.0827, Qui-Quadrado de Aderência e p-valor = 0.4041, teste exato de Fisher).

Tabela 5.8 - Distribuição da recidiva conforme a presença de metalotioneína

Recidiva			Sem Recidiva	
Metalotioneína	n	%	n	%
Positivo	5	62.5	33	76.7
Negativo	3	37.5	10	23.3
Total	8	100	43	100

5.11 Distribuição da recidiva conforme a presença de NF-kB

Não há evidências suficientes para afirmar que a ocorrência de recidiva sofra alteração em função da ocorrência de NF-kB (p-valor = 0.1043, Qui-Quadrado de Aderência e p-valor = 0.6685, Teste Exato de Fisher).

Tabela 5.9 - Distribuição da recidiva conforme a presença de NF-kB

	Recidiva		Sem Recidiva	
	n	%	n	%
NF-kB				
Positivo	7	87.5	33	76.7
Negativo	1	12.5	10	23.3
Total	8	100	43	100

5.12 Distribuição do tabagismo conforme a presença de pAkt

Influência do consumo de tabaco na presença da proteína pAkt (p-valor = 0.6084, Qui-Quadrado de Aderência e p-valor = 0.9986, teste exato de Fisher).

Tabela 5.10 - Distribuição do tabagismo conforme a presença de pAkt

	Fumantes		Não Fumantes	
	n	%	n	%
pAkt				
Positivo	30	71.4	6	66.7
Negativo	12	28.6	3	33.3
Total	42	100	9	100

5.13 Distribuição do tabagismo conforme a presença de NF-kB

Influência do consumo de tabaco na presença da proteína NF-kB (p-valor = 0.0820, Qui-Quadrado de Aderência e p-valor = 0.6630, teste exato de Fisher).

Tabela 5.11 - Distribuição do tabagismo conforme a presença de NF-kB

Fumantes			Não Fumantes	
NF-kB	n	%	n	%
Positivo	32	76.2	8	88.9
Negativo	10	23.8	1	11.1
Total	42	100	9	100

5.14 Distribuição do tabagismo conforme a presença de metalotioneína

Influência do consumo de tabaco na presença da proteína metalotioneína (p-valor = 0.2048, Qui-Quadrado de Aderência e p-valor = 0.6760, teste exato de Fisher).

Tabela 5.12 - Distribuição do tabagismo conforme a presença de metalotioneína

Fumantes			Não Fumantes	
Metalotioneína	n	%	n	%
Positivo	32	76.2	6	66.7
Negativo	10	23.8	3	33.3
Total	42	100	9	100

6 DISCUSSÃO

A identificação de moléculas que estejam associadas à transformação maligna tem permitido identificar marcadores moleculares relacionados com estadiamento tumoral, com o curso clínico das doenças, assim como com o prognóstico. O estudo desses marcadores pode ajudar a encontrar meios de tratamento não cirúrgicos para os carcinomas epidermóides de boca, através da terapia gênica, ou pelo uso de quimioterápicos eficazes que atuem na via de sinalização a que essas proteínas pertençam (VORA et al., 2003).

O presente estudo avaliou a imunoexpressão das proteínas pAkt, metalotioneína e NF- κ B em carcinomas de boca. Os experimentos foram conduzidos com a finalidade de verificar a associação dessas proteínas e de alguns dados clínicos (consumo de tabaco e álcool, tratamento cirúrgico, presença de recidiva, sexo, idade e localização) com a sobrevida em 51 pacientes com carcinomas epidermóides bucais.

Grande parte de nossa amostra constituiu-se de biópsias incisionais, realizadas com fins diagnósticos. É provável que algumas delas não sejam representativas da área mais profunda da lesão. Entretanto, conforme os resultados deste estudo e de trabalhos anteriores (BRYNE et al., 1992; BRYNE, 1998), a gradação de amostras colhidas por biópsia incisional a partir da área com pior padrão de invasão também é predictiva de prognóstico (ODELL et al., 1994), embora a mesma metodologia obtenha melhores resultados quando aplicada a espécimes cirúrgicos terapêuticos (ROLAND et al., 1992).

A razão da escolha dessas proteínas, neste estudo, ocorreu em função delas possuírem interações entre si. A proteína pAkt concorre para a ativação da proteína NF- κ B, possibilitando a transcrição de genes com atividade anti-apoptótica, pró-inflamatórias e de indutoras de proliferação (KWON et al., 2008; SHAH et al., 2005). Nesse sentido, as proteínas PI3K e Akt têm sido requeridas para ativação de NF- κ B, induzida por TNF α e Inteleucina 1 (IL-1), através da fosforilação e ativação da subunidade p65. Ao lado disso, Romashkova e Makarov (1999) mostraram que o PDGF (PDGF- do inglês Platelet-derived growth factor) é capaz de ativar Ras que estimula a via PI3K/Akt. A proteína pAkt, posteriormente, é capaz de fosforilar IKK, liberando NF- κ B da ação repressora de I κ B no citoplasma. Assim, ficou definido que NF- κ B é um alvo da via anti-apoptótica Ras/PI3K/Akt.

Recentemente, tem sido também mostrado que ativação da proteína Akt, estimulada por IL-1, ocasiona fosforilação da subunidade p50 de NF- κ B (LI; STARK, 2002; RAVI; BEDI, 2004). Finalmente, Lee et al. (2005) sugerem que ativação de NF- κ B aumenta a expressão de Akt, assim como Akt aumenta a expressão de NF- κ B em carcinomas gástricos, sugerindo haver, portanto, uma alça regulatória recíproca entre essas proteínas.

A vinculação da MT com NF- κ B encontra-se bem estabelecida na literatura. Abdel-Mageed e Agrawal (1998) observaram uma interação física, em linhagens celulares de adenocarcinomas de mama, da proteína MT com a subunidade p50, do dímero p50/RelA de NF- κ B, sugerindo que tal associação medeia positivamente os efeitos anti-apoptóticos da MT. Butcher et al. (2004), também sugeriram que as MT-1 e MT-2 regulam os níveis celulares e a atividade da subunidade p65 de NF- κ B. A idéia da ativação e interação de NF- κ B pela MT pode ser fortalecida pelo fato dessas duas proteínas compartilharem algumas propriedades: sobre-regulação durante o

desenvolvimento, estímulos que aumentam suas expressões (TNF- α , lipopolissacárides-LPS e IL-1), translocação para o núcleo após ativação ou indução, ambas possuem efeitos anti-apoptóticos e de resistência à drogas antineoplásicas, e finalmente porque tanto a ativação de NF-kB como a indução da expressão de MT ocorrem em regeneração tecidual após hepatectomia in vivo (ABDELL-MAGEED; AGRAWAL, 1998; KIM et al., 2003; TSUJIKAWA et al., 1994).

Em outro estudo foi demonstrado que a sobre-expressão de MT aumenta a ligação de NF-kB ao DNA (KANEKIYO et al., 2001). Kim et al. (2003) mostraram que o aumento da expressão de MT atenua o efeito inibitório do Zn sobre a atividade de NF-kB. Por outro lado Sakurai et al. (1999) demonstraram que a MT pode funcionar como um regulador negativo da atividade de NF-kB, um vez que a MT inibiu a degradação de I κ B α induzida por TNF, assim como inibiu a expressão de genes dependentes da ação de NF-kB.

Em relação à proteína pAkt o resultado de nosso estudo exibiu que a imunoexpressão da proteína pAkt está associada a um menor tempo de sobrevida nos pacientes avaliados. A imunomarcagem da proteína pAkt foi observada tanto no citoplasma como núcleo das células dos carcinomas epidermóides investigados. O papel de pAkt no citoplasma de indutor de proliferação e de bloqueio de apoptose já está bem estabelecido na literatura. Dentre os principais efeitos pAkt no citoplasma estão a inibição da atividade da proteína pró-apoptótica BAD e caspase 9, o aumento da atividade de NF-kB, a indução da transcrição do fator E2F, a retenção das proteínas p27, p21 e do fator de transcrição FKHRL1 no citoplasma e a translocação de Mdm2 e β -catenina para o núcleo. Esses efeitos, em conjunto, contribuem para a proliferação celular e não permitem que a célula caminhe para a morte celular programada (BRUNET et al., 1999; DATTA et al., 1997; DATTA; BRUNET;

GREENBERG, 1999; HAH et al., 2003; MAYO; DONNER, 2002; SÖDERLUNG; PÉREZ-TENÓTIO; STÄL, 2005; VESTEY et al., 2005; ZHANG et al., 2007).

A atribuição da proteína Akt no núcleo, entretanto, ainda não foi amplamente demonstrada. Kikani, Dong e Liu (2005) reportaram que Akt pode ser fosforilado pela proteína PDK1 no núcleo (ANDJELKOVIC et al., 1997). A translocação, para o núcleo após a ativação de Akt na membrana plasmática, ocorre em aproximadamente 30 minutos, evidenciando a existência de substratos para Akt no compartimento nuclear (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999).

Trotman et al. (2006) reportaram que a proteína supressora tumoral PML (do inglês promyelocytic leukemia) inibe a carcinogênese através da desfosforilação e inativação de pAkt localizada no compartimento nuclear. Os autores inferiram que a redução progressiva de PML permite tanto o bloqueio da transcrição mediada por FOXO3a da proteína pró-apoptótica Bim, como interrupção da transcrição da proteína inibidora do ciclo celular p27^{Kip1}. Oportuno lembrar que o fator de transcrição FOXO3 é fosforilado por pAkt no núcleo, inativado e exportado para o citoplasma. Outro estudo relatou que pAkt localizado no núcleo participa dos efeitos anti-apoptóticos promovidos por NGF (do inglês nerve growth factor) ao unir-se com Ebp1 fosforilado por PKC- δ . O complexo pAkt/Ebp1 formado inibe a ação de CAD, um inibidor de fragmentação do DNA dependente da DNase apoptótica. O aumento dos efeitos anti-apoptóticos de Ebp1 ligado a Akt, independe da atividade quinase de Akt, diferente do que ocorre com pAkt citoplasmático (AHN et al., 2006). Recentemente Kwon et al. (2008) contribuíram para o esclarecimento do papel de Akt no núcleo ao mostrarem que Akt1 após ligar-se com Ki-ras, transloca-se para o núcleo, onde se liga ao heterodímero p65/RelA de NF-KB determinando o aumento da atividade transcricional de NF-kB.

Por outro lado o estudo de Maddika et al. (2007) concluiu que pAkt no núcleo desenvolve uma resposta indutora de apoptose. Nessa pesquisa, esses autores mostraram haver uma interação física da proteína apoptina com a subunidade p85 de PI3K, estimulando, desse modo, sua ativação. Posteriormente, a proteína Akt fosforilada transloca-se para o núcleo junto com a proteína apoptina, realizando efeitos pró-apoptóticos. Apoptina é uma proteína rica em prolina codificada pelo gen VP3 de CAV (do inglês vírus anemia infectious chicken) que produz efeitos pró-apoptóticos em células de neoplasias malignas, mas não patrocina a morte celular programada em células não neoplásicas. Em células cancerígenas apoptina migra para o núcleo, através dos poros na membrana nuclear, e promove a morte celular através da ativação da via de morte mitocondrial (liberação de citocromo C e ativação de caspase 3). Tal processo é dependente de Nur77, uma proteína nuclear, que é exportada para o citoplasma, após ser estimulada por apoptina, e que, posteriormente, liga-se a membrana mitocondrial (MADDIKA et al., 2006). A proteína Akt é capaz de fosforilar Nur77 em seu domínio de ligação do DNA, diminuindo sua ligação ao DNA e estimulando sua translocação para o citoplasma (MADDIKA et al., 2006; PERKASKY et al., 2001).

Diante dos resultados obtidos da associação da proteína pAkt com a sobrevivência, nos carcinomas epidermóides investigados, parece-nos lícito sugerir que a proteína pAkt possui, no núcleo, uma função muito mais bloqueadora do que de indutora da morte celular programada. Seria interessante, entretanto, pesquisar a participação das proteínas Nur77 e apoptina nos carcinomas epidermóides de boca.

A relação de pAkt com o tabaco, principal agente etiológico vinculado ao carcinoma epidermóide de boca, tem sido estudada. Nessa linha de raciocínio, convém mencionar o estudo de West et al. (2003) que comprovaram, após análise

das células epiteliais neoplásicas de pulmão e do trato respiratório, que a nicotina e o NNK (do inglês 4-methylnitrosamino-1-3pyridil-1 butanone), dois carcinógenos do tabaco, conduziram a ativação de Akt e de alguns de seus alvos intracelulares como GSK-3, p70S6K, 4EBP-1 e FKHR. Além disso, indução de lesões pré-malignas no pulmão e de hiperplasia no epitélio dos brônquios em porcos, submetidos à inalação de fumaça de cigarro, foi acompanhada por um aumento da ativação de Akt (FIALA et al., 2005).

Os nAChRs (do inglês- nicotinic acetylcholine receptors) são uma classe de receptores responsáveis pela regulação da proliferação e diferenciação de queratinócitos bucais. Tais receptores podem ser formados por heterodímeros compostos por várias subunidades ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$ e $\beta 5$). O repertório de subtipos de nAChRs se altera durante o processo de diferenciação dos queratinócitos no epitélio. A nicotina promove, em queratinócitos bucais, um aumento da subunidade $\alpha 7$ do nAChRs, patrocinando, assim um aumento do influxo de Ca para o interior da célula, o que conduz a ativação de PI3K e de ras e consequentemente aumento de Akt estimulado (ARREDONDO et al., 2008). Em conjunto esses dados sugerem que Akt poder ser estimulado pelos carcinógenos do tabaco em queratinócitos bucais.

Um dos possíveis mecanismos utilizados pela proteína pAkt para redução da sobrevida dos pacientes com carcinoma epidermóide de boca pode estar vinculado à transição epitélio-mesênquima patrocinada por pAkt. A transição epitélio-mesênquima é um importante processo no desenvolvimento e na carcinogênese humana. Nesse processo, as células epiteliais adquirem propriedades semelhantes a fibroblastos, mostram reduzida adesão celular e aumento da motilidade. Linhagens de carcinomas epidermóides de língua que expressam constitutivamente

pAkt sofreram a transição epitélio-mesênquima, e são caracterizadas por baixos níveis de marcadores epiteliais como desmoplaquina, E-caderina e β -catenina, e aumento de marcadores mesenquimais como a vimentina. Tais células perdem a morfologia epitelial e adicionalmente passam a diminuir sua atividade transcricional de E-caderina. Ao lado disso, as células epiteliais passam a exibir adesão reduzida, aumento da motilidade sobre superfícies cobertas com fibronectina e aumento da invasividade em animais (GRILLE et al., 2003; LIM et al., 2004). Transição epitélio-mesênquima coordenada por Akt pode conferir a motilidade requerida para invasão e metástase.

Estimulação de AKT ocasiona também potencialização da transcrição de alguns genes como SNAIL que reprimem a transcrição de E-caderina. Então além de internalizar E-caderina, Akt reprime a transcrição de E-caderina (GRILLE et al., 2003). Oportuno mencionar, a relação de pAkt com Anoikis. Anoikis é um termo reservado para apoptose induzida pelo desgarramento celular. Esta forma de apoptose desempenha um papel fundamental na prevenção de invasão e metástase em carcinomas. Expressão de Ras ativado, em certas células, permite inibição da Anoikis via ativação de Akt (VAZQUEZ; SELLERS, 2000). Esses dados sugerem que futuras terapias baseadas na inibição de Akt podem complementar tratamentos convencionais e levar ao controle da invasão celular e metástase dos carcinomas epidermóides. Lim et al. (2005) após avaliarem, através de imunoistoquímica 81 amostras de carcinoma epidermóide de boca, observaram que a sobre-expressão de pAkt correlacionou-se com baixa expressão de E-caderina, sugerindo a participação de pAkt na transição epitélio-mesênquima em carcinomas epidermóides de boca.

Ainda sob a participação de pAkt sobre a motilidade e invasividade das células neoplásicas, Toker e Yoeli-Lerner (2006) relataram que a proteína Akt1

bloqueou a invasão de células de carcinoma de mama em matrigel e Akt2 induziu a invasão e que em ambas as isoformas de Akt promoveram seus efeitos através do bloqueio e estímulo, respectivamente, do fator de transcrição NFAT (do inglês nuclear factor activated T cells).

Várias pesquisas foram desenvolvidas com a finalidade de vincular a proteína Akt à carcinogênese da região de cabeça e pescoço. Mandal et al. (2006) e Amornphimoltham et al. (2004) mostraram que Akt apresenta expressão aumentada em HNSCC (do inglês squamous cell carcinoma of head and neck) e Gupta et al. (2002) sugeriram a participação do receptor EGF e da ativação da via PI3K/Akt na radioresistência de carcinomas de cabeça e pescoço. Os autores inferiram que a fosforilação de Akt via PI3K pode ser usado como um marcador prognóstico para resposta à radioterapia. Já foi estabelecido, também, que a Akt estimula a expressão da metaloproteinase 9 em linhagens celulares de HNSCC, o qual desempenha um papel importante na invasão e metástase de neoplasias malignas (KAOMONGKOLGIT et al., 2007). Sasabe et al. (2005) relataram que o fator de transcrição HIF-1 (do inglês hypoxia-inducible factor-1), o qual promove angiogênese e inibição da apoptose em condições de hipóxia, previne a apoptose através da ativação de Akt em linhagens de carcinomas epidermóides de boca.

A maioria das amostras de carcinomas epidermóides de boca utilizadas nesta pesquisa pertencia a pacientes em estádios III e IV. Nessa linha de pensamento, convém mencionar o trabalho de Kozaki et al. (2006) que reportou a presença de mutação no gene PIK3CA, o qual codifica a subunidade catalítica 110-kDa de PI3K, especialmente em carcinomas de boca que se encontravam em estágio IV. Esses resultados associados à influência de pAkt na sobrevida, obtido neste estudo,

sugere que mutação na via PI3K/Akt deve ser um evento tardio no processo de carcinogênese bucal.

Em linhagens de células de carcinomas epidermóides de boca, o controle da apoptose, via Fas-L, requer ativação da via de sinalização PI3K/Akt. A proteína Akt ativada induz o aumento da expressão de c-FLIP (do inglês cellular FLICE-inhibitory protein), proteína que inibe apoptose por bloqueio da ação do complexo FADD/caspase 8/ DISC (IWASE et al., 2007; KONDO et al., 2006). Sundelin et al. (1997) não evidenciaram a imunoexpressão do receptor Fas em células epiteliais da mucosa bucal, porém comprovaram a expressão desse receptor em todos os 24 casos de carcinomas epidermóides de língua pesquisados. Além disso, já está demonstrado, em carcinomas epidermóides bucais, que a expressão de Fas está vinculada à resistência a quimio e radioterapia, aos índices de recorrência, ao estadiamento e a sobrevida (GULER et al., 2005; MURAKI et al., 2000).

Dois recentes estudos conduzidos por Lim et al. (2005) e Massarelli et al. (2005) também relataram o valor da expressão de pAkt como marcador prognóstico em carcinomas epidermóides de boca, e Yu et al. (2007) demonstraram que a expressão de pAkt associa-se a pobres resultados clínicos (maior recorrência e menor sobrevida) em carcinomas epidermóides da região bucal e faringiana.

Por aumentar a expressão de genes que estimulam a proliferação e sobrevida, além de promover angiogênese e metástase, a via NF-kB desempenha um papel chave na iniciação e manutenção do fenótipo oncogênico (YAMAMOTO; GAYNOR, 2004). Além disso, ativação da via NF-kB após quimio e radioterapia, permite indução de inibidores da apoptose, resultando em diminuída morte celular programada (ROJO et al., 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

Embora a proteína NF- κ B não tenha mostrado associação estatisticamente significativa com um pior prognóstico, nos casos levantados em nossa pesquisa, a expressão de NF- κ B foi associada a expressão da proteína pAkt, corroborando com os resultados encontrados por Fenic et al. (2007). Esses resultados nos permitem inferir que a proteína pAkt pode controlar a morte celular programada e estimular proliferação utilizando-se, também, da ativação da proteína NF- κ B, via fosforilação de IKK. Tal asseveração encontra sustentação em alguns estudos como o de Tsurutani et al. (2005) que mostrou que alguns componentes do tabaco (nicotina e NNK) induziram proliferação celular, em carcinomas de pulmão, através da ativação de Akt e inibição da apoptose dependente de NF- κ B. O Tabaco, também, mostrou estimular as células epiteliais das vias aéreas, assim como de células do sistema imune, a liberarem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , que por sua vez ativam a transcrição da via NF- κ B permitindo a regulação de vários genes relacionados à inflamação, incluindo IL-6 (do inglês interleukin-6), IL-8 e COX2 (CAMPA et al., 2004).

Nessa linha de pensamento, o estudo conduzido por Tamatani et al. (2001) constatou um aumento na expressão de IKK, em linhagens de células de carcinomas epidermóides da região de cabeça e pescoço, quando comparada com expressão desse complexo protéico observada em células normais. Oportuno, também, mencionar a pesquisa de Nakayama et al. (2001) que reportou um aumento na expressão da subunidade p65 de NF- κ B, além de IKK α e de Akt em carcinomas epidermóides de boca, quando comparadas com o epitélio normal e com áreas displásicas. Finalmente Santhi et al. (2006) relataram que a expressão citoplasmática e nuclear de NF- κ B aumentou com a progressão histológica após

análise do tecido normal, leucoplásico e em cortes que exibiam carcinomas epidermóides de boca.

Outros estudos têm confirmado a participação da via Akt/NF-kB na indução dos efeitos anti-apoptóticos em carcinomas epidermóides de boca. Sandra et al. (2002) encontraram, em linhagens de células de carcinomas epidermóides da região de cabeça e pescoço, uma ligação da fosforilação de Akt /degradação de IκB com a inibição da apoptose induzida via TNF (do inglês tumour necrosis factor) e Chen, Fribley e Wang (2002) informaram que inibição da ação de NF-kB sensibilizou as células de carcinomas epidermóides de boca à apoptose via TNF. Adicionalmente, esses autores informaram, que o bloqueio de NF-kB aumentou a ativação de caspase 8 e caspase 3 via TNF.

Convém aclarar que os efeitos anti-apoptóticos patrocinados por NF-kB podem ocorrer através da regulação da transcrição do receptor e da molécula sinalizadora Fas (CHAN; BARTOS; OWEN-SCHAUB, 1999; KASIBHATLA; GENESTIER; GREEN, 1999), cuja relação com carcinoma epidermóide de boca e com a proteína Akt foi discutida anteriormente. Acrescenta-se, ainda, que Fujita et al. (2004) relataram uma elevação da expressão de NF-kB em células de carcinoma epidermóide de boca submetidas a ação do ácido okadaico, substância conhecida por aumentar a expressão de Fas-L e do receptor Fas.

A proteína NF-kB pode patrocinar efeitos anti-apoptóticos por outros caminhos, revisado em Barkett e Gilmore (1999). Nessa direção, convém analisar, em carcinomas epidermóides bucais, a expressão dos alvos *downstream* de NF-kB que executam os efeitos anti-apoptóticos como as proteínas FLIP (do inglês FLICE-like inhibitory protein), TRAF2 e TRAF6, das proteínas IAPs (do inglês Inhibitors of apoptosis) e de BAX (DOLCET et al., 2005; RAVI; BEDI, 2004; SCHUCHMANN;

GALLE, 2002). O mapeamento dessas proteínas auxiliará na busca por mais quimioterápicos que sejam efetivos no tratamento dos carcinomas epidermóides albergados na boca.

Já o envolvimento da proteína NF- κ B com a motilidade e invasão em carcinomas epidermóides bucais foi avaliado por Ikebe et al. (2004). Esses pesquisadores constataram que fibroblastos do estroma de carcinomas epidermóides bucais aumentaram a indução de metaloproteinase 9, motilidade celular e a ativação de NF- κ B. Em outra pesquisa Bindhu et al. (2006) também encontraram um aumento da expressão da atividade de metaloproteinase 9 correlacionada com o aumento da expressão de NF- κ B na progressão histológica, após analisarem lesões leucoplásicas e de carcinomas epidermóides de boca, sugerindo um papel de NF- κ B sobre a ativação de gelatinases durante a transformação maligna da mucosa bucal. Finalmente, Takamune et al. (2008) demonstraram, em linhagens de células de carcinomas epidermóides bucais, que TNF α induziu a ativação, por clivagem, da enzima ADAM-17 (do inglês disintegrin and metalloprotease domain) de maneira dependente de NF- κ B e o uso de inibidores de ADAM-17 suprimiu a invasão induzida por TNF α nas células neoplásicas investigadas. Os autores sugeriram também que ADAM-17 promove invasão por clivar a proteína CD44, uma molécula de adesão de superfície o qual se liga ao ácido hialurônico, assim como realiza uma variedade de funções celulares como migração, proliferação e apoptose.

Já está estabelecido, também, na literatura a interação existente entre NF- κ B e a proteína p53. Antagonismo das funções de transcrição que ocorre entre p53 e NF- κ B envolve competição com co-ativadores como p300 e CBP (do inglês CREB-binding protein). Além disso, a proteína p53 reprime a expressão de Bcl-3, um co-

ativador transcricional da subunidade p52 de NF- κ B. Ao lado dessa asseveração, a ativação de NF- κ B mediada por IKK2 tem mostrado proteger células de apoptose induzida por dano no DNA, através do aumento dos níveis de Mdm2 (DOLCET et al., 2005; PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004).

Acrescido aos efeitos de controle da morte celular programada, NF- κ B pode estimular a proliferação celular. NF- κ B promove progressão do ciclo celular por regular a expressão de vários genes envolvidos na maquinaria do ciclo celular como as ciclinas D1, D2 e D3, além de c-myc e c-mycb. Expressão de ciclina D1 induzida por NF- κ B parece ser o elemento chave no desenvolvimento de glândulas mamárias e carcinogênese de mama (AGGARWAL, 2004; DOLCET et al., 2005; KUMAR et al., 2004; RAVI; BEDI, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004). Além disso, NF- κ B induz a expressão de ciclooxigenase-2 (COX2), cuja expressão é importante para o crescimento neoplásico, como observado em carcinomas de cólon, uma vez que COX-2 induz a expressão de alguns fatores angiogênicos (VEGF, FGF, PDGF, TGF- β) e de seus receptores na superfície das células endoteliais (DOLCET et al., 2005; PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

Esses dados, analisados em conjunto, permitem-nos inferir que quimioterápicos que atuem no controle da ativação de NF- κ B podem ser úteis no tratamento de carcinomas epidermóides da região de cabeça e pescoço. Inúmeras comprovações dessa afirmação têm sido exibidas na literatura. Vários estudos mostraram que muitas drogas antineoplásicas, em carcinomas epidermóides bucais, atuam inibindo a invasão local, a metástase para os nódulos linfáticos regionais, o controle da angiogênese através da supressão da atividade de NF- κ B (BEPPU; IKEBE; SHIRASUNA, 2002; HARADA et al., 2007; LEE et al., 2007; TAKADA et al.,

2004; TAMATANI et al., 2007; TANIGUCHI et al., 2005; WAES et al., 2005; YAO et al., 2006; YAO et al., 2007).

O controle transcricional da indução de MT e mudanças em sua localização nuclear/citoplasmática durante proliferação e diferenciação celular sugerem que alterados níveis de MT podem ser esperados em situações onde há crescimento anormal, como no carcinoma (CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003). A metalotioneína é uma proteína de localização principalmente citoplasmática em tecidos adultos. Embora não tenha sido identificado um local de ligação da MT ao DNA, sua transição para o núcleo ocorre sob certas condições de proliferação e diferenciação celulares (ABDEL-MAGEED; AGRAWAL, 1998; CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003).

A imunoexpressão da proteína MT foi observada tanto no núcleo como no citoplasma das células dos carcinomas epidermóides investigados, neste estudo, assemelhando-se aos modelos encontrados em neoplasias malignas humanas de outros tecidos (THEOCHARIS et al., 2004). Cherian, Jayasurya e Bay (2003), em estudo de revisão, comentam que a translocação da MT para o compartimento nuclear durante a fase proliferativa (G1-S) do ciclo celular em neoplasias humanas suporta o papel de doadora de Zn realizado pela MT durante o crescimento neoplásico.

Um padrão de marcação em mosaico para a proteína MT foi observado nos carcinomas epidermóides estudados, com células fortemente imunomarcadas em algumas áreas, enquanto outros campos, na mesma lâmina, mostravam-se negativos. Acreditamos que esse padrão em mosaico pode ser fruto das diferenças fenotípicas celulares adquiridas durante a progressão neoplásica.

Nos carcinomas epidermóides bem diferenciados, somente as células neoplásicas localizadas na periferia das ilhas tumorais foram marcadas, enquanto as células situadas centralmente permaneceram negativas. Quando havia presença de pérolas de queratina somente as camadas celulares basais e parabasais mostravam-se reativas. Para Sundelin et al. (1997) a marcação periférica da MT reproduz o padrão de marcação encontrado no epitélio normal e pode ajudar a desviar essas células da morte celular programada. O padrão de imunomarcação observado neste estudo foi semelhante ao encontrado por Cardoso et al. (2002).

A análise da expressão da proteína MT não promoveu resultados estatisticamente significantes quando associado à sobrevida dos pacientes com carcinomas epidermóides envolvidos neste estudo. Os resultados obtidos neste estudo não concordaram com os revelados pela pesquisa conduzida por Cardoso et al. (2002) que encontraram relação estatisticamente significativa da MT com a sobrevida, ao analisarem a imunomarcação da MT em 60 carcinomas epidermóides de boca. Os resultados conflitantes podem estar associados à metodologia empregada. Cardoso et al. (2002) realizaram a contagem de 500 células e consideraram o caso como positivo quando havia 76% de imunoreatividade entre as células analisadas. O padrão em mosaico de marcação, comentado anteriormente, dificulta, em nosso entendimento, a escolha dos campos a serem contados. Esse fato pode ter contribuído para as discordantes conclusões. Assim, todos os 60 casos da pesquisa de Cardoso et al. (2002) foram considerados positivos, já a presente pesquisa encontrou 17 lâminas negativas das 51 pesquisadas.

Um dos mais importantes problemas na quimioterapia do carcinoma epidermóide é a resistência adquirida às drogas, e o mecanismo que possivelmente contribui para este fenômeno é o seqüestro de agentes alcalinizantes pela MT.

Entretanto, dados obtidos de muitos trabalhos indicam que a resistência a quimioterapia mostrada em diferentes tipos de neoplasias não pode ser explicada por uma única via (THEOCHARIS et al., 2004).

É bem conhecido o papel da MT em ligar-se a radicais livres e a outros possíveis agentes citotóxicos. Após radioterapia, células neoplásicas produzem espécies reativas derivadas do oxigênio, moléculas que são úteis ao tratamento devido sua genotoxicidade (CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; CROMPTON, 1998; THEOCHARIS et al., 2004). Alguns quimioterápicos induzem similar mecanismo ou causam dano celular direto por conterem metais pesados. Em função das características bioquímicas da MT, espécies reativas do oxigênio e metais pesados podem se ligar as MT, tendo bloqueadas, assim, suas funções de injúria celular e conseqüente apoptose (CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; KONDO et al., 1995; THEOCHARIS et al., 2004). Nakano et al. (2003) relataram que as isoformas MTI e MTIII foram induzidas após tratamento com o quimioterápico Cisplatina, podendo desempenhar um importante papel na resistência à Cisplatina em carcinomas epidermóides de língua.

Em nosso estudo, a relação entre pAkt e MT foi avaliada como significativamente discordante, o que supõe que pAkt e metalotioneína realizam o controle de apoptose sem interação direta entre si. Um mecanismo que se poderia hipotetizar seria uma relação indireta de pAkt com a MT via NF- κ B. Tal possibilidade se sustenta nos resultados estatísticos que indicaram que as três proteínas (pAkt, NF- κ B e MT) apresentaram concordância entre si. A interação de NF- κ B com a MT é necessária, no compartimento nuclear, para os efeitos de transcrição patrocinados por NF- κ B e pAkt possui capacidade de inativar os repressores citoplasmáticos de NF- κ B. Essas assertivas mostram que tanto pAkt como MT concorrem para ativação

de NF- κ B. Corroborando com essas afirmações nossos resultados mostraram que NF- κ B apresentou expressão concordante com a expressão de MT, sugerindo um papel para MT na ativação de NF- κ B nos carcinomas epidermóides pesquisados.

Por outro lado, MT poderia exercer seus efeitos anti-apoptóticos, em carcinomas epidermóides bucais, através do bloqueio da ação da proteína p53. Douglas-Jones et al. (1997) sugeriram que MT poderia remover Zn de p53, bloqueando sua atividade indutora de morte celular programada e Ostrakhovitch et al. (2006) demonstraram, em cultura de células de carcinomas de mama, uma interação entre MT1 e p53, sugerindo que a co-expressão de MT1 e p53 pode estar envolvida na regulação da apoptose nessas células. Finalmente, já foi demonstrado que combinada deficiência de zinco e da proteína p53 permite extrema sensibilidade à transformação maligna utilizando 4NQO (do inglês 4- nitroquinoline 1-oxide) em baixas concentrações em um modelo experimental de carcinogênese bucal realizado em camundongos (FONG; JIANG; FARBER, 2006).

Nesta pesquisa, a variável clínica cirurgia se mostrou associada a um maior tempo de sobrevida. Um estudo recente conduzido por Lung et al. (2007) corrobora os nossos resultados, mostrando que o tratamento que apresenta melhores resultados, para o carcinoma epidermóide nos estádios precoces (I e II), é o cirúrgico aplicado isoladamente e nos estádios avançados (III e IV) o tratamento cirúrgico combinado à radio e/ou à quimioterapia.

O consumo de álcool também mostrou interferir na sobrevida dos pacientes avaliados neste estudo. O etilismo associado ao tabagismo constitui o maior fator etiológico do carcinoma epidermóide bucal, sendo que o risco aumenta proporcionalmente à quantidade consumida (LEWIN et al., 1998; MCCAFFREY et al., 2007). O álcool aumenta a permeabilidade da mucosa bucal humana, em

pequeno espaço de tempo, facilitando, assim, a penetração dos carcinógenos do tabaco (HOWIE et al., 2001). Hindle et al. (2000) em um estudo retrospectivo, também, associaram o aumento na incidência e da mortalidade dos carcinomas epidermóides bucais ao consumo de álcool, mais do que ao consumo de tabaco.

Considerável controvérsia existe na literatura sobre os pacientes considerados jovens que apresentam carcinoma epidermóide de boca. A discussão começa com a idade a ser estipulada para pacientes considerados jovens. Alguns autores determinam a idade limite como sendo de 40 anos (IYPE et al., 2001; SASAKI et al., 2005; SIRIWARDENA et al., 2006; VARGAS et al., 2000) enquanto outros determinam 45 anos (GOLDSTEIN; IRISH, 2005). Outro ponto polêmico diz respeito ao comportamento da neoplasia nesses pacientes, havendo relatos na literatura que mostram um curso mais agressivo para pacientes considerados jovens (VARGAS et al., 2000), enquanto outros estudos não relatam diferenças no prognóstico (GOLDSTEIN; IRISH, 2005; SASAKI et al., 2005; SIRIWARDENA et al., 2006). A porcentagem de pacientes jovens em várias partes do mundo varia em torno de 5 a 6% e o sítio mais acometido é a língua (GOLDSTEIN; IRISH, 2005; SIRIWARDENA et al., 2006). Em nosso estudo, consideramos pacientes com idade até 45 anos como jovem, por ser essa a idade mais adotada na literatura. Não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida entre os dois grupos de pacientes. A língua foi o sítio mais acometido nos pacientes considerados jovens. Importante ressaltar a elevada taxa (15,7%) de pacientes considerados jovens encontrada em nossa pesquisa quando comparado aos índices relatados em outras regiões do mundo. Não conseguimos identificar fatores que conduziram a um aumento na incidência de carcinomas epidermóides de boca em pacientes considerados jovens.

7 CONCLUSÕES

Após concluídas as reações de imunoistoquímica e a avaliação dos resultados conclui-se que:

3.1 Houve correlação estatisticamente significativa entre a imunoexpressão da proteína pAkt e a sobrevida nos casos de carcinomas epidermóides investigados.

3.2 Houve correlação estatisticamente significativa entre o consumo de álcool e a sobrevida dos pacientes com carcinomas epidermóides pesquisados.

3.3 Houve correlação estatisticamente significativa entre o tratamento cirúrgico e a sobrevida dos casos de carcinomas epidermóides estudados.

3.4 O aumento da imunoexpressão da proteína pAkt associou-se a um aumento na expressão das proteínas metalotioneína e NF-kB.

REFERÊNCIAS¹

Abdel-Mageed AB, Agrawal KC. Activation of nuclear factor kB: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Res* 1998;58:2335-8.

Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;28:1322-6.

Aggarwal BB. Nuclear factor-kB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004;6:203-8.

Ahn J, Liu X, Liu Z, Pereira L, Cheng D. Nuclear Akt associates with PKC-phosphorylated Ebp1, preventing DNA fragmentation by inhibition of caspases-activated DNase. *EMBO J* 2006;25:2083-95.

Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, Benavides F, Conti CJ, Vimutil S, et al. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a Potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res* 2004;10:429-37.

Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJC, French M, et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997;272(50):31515-24.

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

Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinnavar FF, Bray MR, Snow BE, Sawyer BD, et al. Overexpression of Akt2/protein kinase B β leads to up-regulation of β 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2003;63:196-206.

Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grand SA. Receptor-mediated tobacco toxicity: acceleration of sequential expression of α 5 and α 7 nicotinic receptor subunits in oral keratinocytes exposed to cigarette smoke. *FASEB J* 2008;22:1-13.

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

Ayres M, Ayres Jr, Ayres DL, Santos AAS (2008). Bioestat Versão 5.0. Sociedade Civil Mamirauá, MCT – CNPq. Belém, Pará, Brasil.

Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6910-24.

Beppu M, Ikebe T, Shirasuna K. The inhibitory effects of immunosuppressive factors, dexamethasone and interleukin-4, on NF- κ B-mediated protease production by oral cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002;1586:11-22.

Beyersmann D, Haase H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Bio Metals* 2001;14:331-41.

Bindhu OS, Ramadas K, Sebastian P, Pillai MR, Path FRC. High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2006;28:916-25.

Blackhall FH, Pintilie M, Michael M, Leigh N, Feld R, Canto MT, et al. Expression and prognostic significance of kit, protein kinase in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:2241-7.

Blagosklonny MV. Are p27 and p21 cytoplasmatic oncoproteins? *Cell Cycle* 2002;1(6):391-3.

Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA. Akt/Protein Kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* 2001;61:3986-97.

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

Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostic? *Oral Dis* 1998;4:70-7.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992;166:375-81.

Butcher HL, Kennette WA, Collins O, Zalups RK, Koropatnick J. Methallotionein mediates the level and activity of nuclear factor kB in murine fibroblasts. *J Pharmacol Exp Therap* 2004;310:589-98.

Campa D, Zienolddiny S, Maggini V, Skaug V, Haugen A, Canzian F. Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2004;25(2):229-35.

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

Cao Y, Karin M. NFkB in mammmary gland development and breast cancer. *J Mammmary Gland Biol Neop* 2003;8(2):215- 23.

Cardone HM, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282:1318-21.

Cardoso SV, Barbosa HM, Candellori IM, Loyola AM, Aguiar MC. Prognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2002;441:174-8.

Chadha KS, Khoury T, Yu J, Black JD, Gibbs JF, Kuvshinoff BW, et al. Activated Akt and Erk expression and survival after surgery in pancreatic carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2006;13(7):933-9.

Chan H, Bartos DP, Owen-Schaub LB. Activation-dependent transcriptional regulation of the human fas promoter requires NF-kB p50-p65 recruitment. *Mol Cell Biol* 1999;19:2098-108.

Chen S, Fribley A, Wang CY. Potentiation of tumor necrosis factor-mediated apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells by adenovirus-mediated gene transfer of NF-kB inhibitor. *Res Rep* 2002;81:98-102.

Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* 2003;533:201-9.

Cherian MG, Kang YJ. Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp Biol Med* 2006;231:138-44.

Chin D, Boyle GM, Williams RM, Fergusson K, Pandeya N, Pedley J, et al. Novel markers for poor prognostic in head and neck cancer. *Int J Cancer* 2005;113:789-97.

Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, Trastuzumab, or Tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Therap* 2002;1:707-17.

Crompton NEA. Programmed cellular response in radiation oncology- basic and translational studies. *Acta Oncol* 1998;37:1-49.

Dai DL, Martinka M, Gang L. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol* 2005;23:1473-82.

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

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91(17):231-41.

David O, Jett J, LeBaeau H, Dy G, Hughes J, Gu W, et al. Phospho-Akt overexpression in non-small cell lung cancer confers significant stage independent survival disadvantage. *Clin Cancer Res* 2004;10(15):6865-71.

Del Peso L, Garcia MG, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997;278(5338):687-93.

Delord JP, Allal C, Canal M, Mery M, Rochaix P, Zheng F, et al. Selective inhibition of HER inhibits Akt signal transduction and prolongs disease-free survival in a micrometastasis model of ovarian carcinoma. *Ann Oncol* 2005;11:1-9.

Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guin X. NFkB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch* 2005;446:475-82.

Douglas-Jones AG, Navabi H, Morgan JM, Jasani B. Immunoreactive p53 and metallothionein expression in duct carcinoma in situ of the breast. No correlation. *Virchows Arch* 1997;430:373-9.

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

Feng J, Tamaskovic R, Yang Z, Brazil PD, Merlo D, Hess D, et al. Stabilization of mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279(34):35510-7.

Fenic I, Steger K, Gruber C, Arens C, Woenckhaus J. Analysis of PIK3CA and Akt/protein kinase B in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007;18:253-9.

Fiala ES, Sohn OS, Wang, CX, Seibert E, Tsurutani, J. Induction of preneoplastic lung lesions in guinea pigs by cigarette smoke inhalation and their exacerbation by high dietary levels of vitamins C and E. *Carcinogenesis* 2005;26:605-12.

Fong LYY, Jiang Y, Farber JL. Zinc deficiency potentiates induction and progression of lingual and esophageal tumors in p53-deficient mice. *Carcinogenesis* 2006;27:1489-96.

Fradet V, Lessard L, Bégin LR, Karakiewicz P, Masson AMM, Freg H, et al. Nuclear factor- κ B nuclear localization is predictive of biochemical recurrence in patients with positive margin prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:8460-4.

Fujita M, Goto K, Yoshida K, Okamura H, Morimoto H, Okada S, et al. Okadaic acid stimulates expression of fas receptor and fas ligand by activation of nuclear factor kappa-B in human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2004;40:199-206.

Goldstein DP, Irish JC. Head and neck squamous cell carcinoma in the young patient. *Current Opinion Otolaryngol Haed Neck Surg* 2005;13:207-11.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, Van Roy F, Grenn D, et al. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous carcinoma lines. *Cancer Res* 2003;63:2172-8.

Guler N, Uckan S, Celik I, Oznurlu Y, Uckan D. Expression of fas and fas-ligand and analysis of argyrophilic nucleolar organizer regions in squamous cell carcinoma: relationship with tumor stage and grade and apoptosis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34:900-6.

Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Meckfill B, et al. Local recurrence in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:885-92.

Hacker H, Karin M. Is NF κ B2/p100 a direct activator of programmed cell death? *Cancer Cell* 2002; 33:431-433.

Haddadin KJ, Soutar DS, Webster MHC, Robertson AG, Oliver RJ, Macdonald DG. Natural history and patterns of recurrence of tongue tumours. *Br J Plast Surg* 2000; 53: 279-285.

Hah J, Lee K, Choi YJ, Kim W, Park JW, Gu W, et al. Inactive caspase 3 activates Akt in human leukemia cells susceptible or resistant to apoptosis induced by phorbol ester. *Int J Oncol* 2003;22:1111-6.

Han SW, Khuri FR, Roman J. Fibronectin stimulates non-small lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Res* 2006;66:315-323.

Haq F, Mahoney M, Koropatnick R. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Res* 2003;533:211-26.

Harada K, Supriatno T, Kawashima Y, Yoshida H, Sato M. S-1 inhibits tumorigenicity and angiogenesis of human oral squamous cell carcinoma cells by suppression of phosphorylated Akt, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2. *Int J Oncol* 2007;30:365-74.

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

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF κ B. *Gen Develop* 2004;18:2195-224.

Hindle I, Dower MC, Moles DR, Speight PM. Is alcohol responsible for more intra-oral cancer? *Oral Oncol* 2000;36:328-33.

Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Mullet DZ, et al. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis* 2001;7:349-54.

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

Hu TH, Huang CC, Lin PR, Chang HW, Ger LP, Shu VK, et al. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003;97(8):1929-40.

Husseiny GE, Kandil A, Khafaga AJY, Saleem M, Rajhi NA, Gifh M, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000;38:193-9.

Ikebe T, Nakayama H, Masanori S, Shirasuna K. NF- κ B involvement in tumor-stroma interaction of squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40:1048-56.

Iwase M, Takaoka S, Uchida M, Yoshiba S, Kondo G. Epidermal growth factor receptor inhibitors enhance susceptibility to fas-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncol* 2007;56:49-57.

Iype EM, Pandey M, Mathew A, Thomas G, Sebastian P, Petter G, et al. Squamous cell carcinoma of the tongue among young indian adults. *Neoplasia* 2001;3:273-7.

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

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

Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, Shimada M, Takahashi M, Kimura D, et al. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;8:92-5.

Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 1999;253:210-29.

Kanekiyo M, Itoh N, Kawasaki A, Tanaka J, Nakanishi T. Zinc-Induced activation of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter is mediated by metallothionein and nuclear factor- κ B toxicology and applied. *Pharmacology* 2001;173:146-53.

Kaomongkolgit R, Cheepsunthorn P, Pavasant P, Sanchavanakit N. Iron increases MMP-9 expression through activation of AP-1 via ERK/Akt pathway in human head and neck squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2007;11:1-10.

Kari S, Alho OP, Jokinen M, Hyrynkangas K, Laara E. Carcinoma of the oral tongue in northern finland: trends in overall incidence and patient and tumour characteristics. *J Oral Pathol Med* 1997;26:480-3.

Kasibhatla S, Genestier L, Green DR. Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kB. *J Biol Chem* 1999;274:987-92.

Kikani CK, Dong LK, Liu F. New-clear functions of PDK1: beyond a master kinase? *J Cell Biochem* 2005;96:1157-62.

Kim CH, Kim JH, Lee J, Ahn YS. Zinc-induced NF-kB inhibition can be modulated by changes in the intracellular metallothionein level. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;190:189-96.

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

Kondo G, Iwase M, Watanabe H, Uchida M, Takaoka S. Enhancement of susceptibility to Fas-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor. *Oral Oncol* 2006;42:745-52.

Kondo Y, Woo ES, Michalska AE, Choo KHA, Iazo JS. Metallothionein null cells have increased sensitivity to anticancer drugs. *Cancer Res* 1995;55:2021-3.

Kozaki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Hasegawa S, Tsuda H. PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2006;97:1351-8.

Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kB: its role in health and disease. *J Mol Med* 2004;82:434-48.

Kwon O, Kim KA, He L, Jung M, Jeong SJ. Complex formation of p65/RelA with nuclear Akt1 for enhanced transcriptional activation of NF-kB. *Biochem Biophys Res* 2008;365:771-6.

Lam L, Logan RM, Luke C. Epidemiological analysis of tongue cancer in south Australia for the 24-year period 1977-2001. *Aust Dent J* 2006;51(1):16-22.

Lee BL, Lee HS, Jung J, Cho SJ, Chung HY, Kim WH, et al. Nuclear factor- κ B activation correlates with better prognosis and Akt activation in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(17):2518-25.

Lee TK, Poon RT, Wo JY, Ma S, Guan XY. Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappaB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 2007;67:8800-9.

Leslie NR, Downes CP. The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signall* 2002;14:285-295.

Lessard L, Masson AMM, Lamarre L, Wall L, Lattouf JB, Ghend S, et al. NF κ B nuclear localization and its prognostic significance in prostate cancer. *BJU Int* 2003;91:417-20.

Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Nillev F, et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1998;82:1367-75.

Li X, Stark GR. NF- κ B-dependent signaling pathways. *Exper Hematol* 2002;30:285-96.

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

Lim SC, Zhang S, Ishii G, Endoh Y, Kodama K. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res* 2004;10:166-72.

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

Lung T, Tascau OC, Almasan HA, Muresan O. Head neck cancer, evolution and post therapeutic survival - part 2: a decade's results 1993-2002. *J Cranio-Maxillofac Surg* 2007;35:126-31.

Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 2002;4:257-62.

Maddika S, Bay GH, Kroczaek, TJ, Ande SR, Mandikka EW. Akt is transferred to the nucleus of cells treated with apoptin, and it participates in apoptin-induced cell death. *Cell Proliferation* 2007;40:835-48.

Maddika S, Mendoza FJ, Hauf K, Zamzow CR, Paranjothy T, Zhun D, et al. Apoptin and its mechanism of action. *Cancer Biol Ther* 2006;5:10-9.

Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, Troyer DA, Prihoda T, Fullic G, et al. Immunohistochemical demonstration of phosphor-Akt in high gleason grade prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1168-71.

Mandal M, Younes M, Swan EA, Jasser SA, Doan D. The Akt inhibitor KP372-1 inhibits proliferation and induces apoptosis and anoikis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2006;42:430-9.

Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutrition* 2000;130:1455-8.

Massareli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Muzio LL, Shinn SF, et al. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer* 2005;104:2430-6.

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

Mayo LD, Dixon JE, Durden DL, Tonks NK, Donner BD. Pten protects p53 from mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *J Biol Chem* 2002;277(7):5484-9.

McCaffrey JC, Weitzner M, Kamboukas D, Haselhuhn G, LaMonde L. Alcoholism, depression, and abnormal cognition in head neck cancer: a pilot study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;136:92-7.

Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B β . *J Biol Chem* 1997;272(48):30491-7.

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

Moynagh PN. The NF κ B pathway. *J Cell Sci* 2005;118:4389-92.

Muraki Y, Tateishi A, Seta C, Fukuda J, Haneji T, Tujymoto J, et al. Fas antigen expression and outcome of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000;29:360-5.

Nakano M, Sogawa CA, Sogawa N, Mishima K, Yamashita E. Expression pattern of cisplatin-induced metallothionein isoforms in squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2003;23:299-303.

Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Lu H, et al. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *Cancer* 1999;274(31):21528-32.

Nakayama H, Ikebe T, Beppu M, Shirasuna K. High expression levels of nuclear factor κ B, I κ B kinase α and Akt kinase in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 2001;92(12):3037-44.

Navolanic P, Steelman LS, McCubrey J.A. EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy (Review). *Int J Oncol* 2003;274(31):21528-32.

Odell EW, Jani P, Sherriff M, Ahluwalia SM, Hibbert J, Levison DA, et al. The prognostic value of individual histologic grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. *Cancer* 1994;74:789-94.

Oren M, Damalas A, Gottlieb T, Michael D, Taplick J, Leal MFM, et al. Regulation of p53: intricate and delicate balances. *Biochem Pharmacol* 2002;64:865-71.

Ostrakhovitch EA, Olsson PL, Jiang S, Cherian MG. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. *FEBS Letters* 2006;580:1235-8.

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

Papouli E, Defais M, Larminat F. Overexpression of metallothionein-II sensitizes rodent cells to apoptosis induced by DNA cross-linking agent through inhibition of NF- κ B activation. *J Biol Chem* 2002;227(7):4764-9.

Perkasky Y, Hallas C, Palamarchuk A, Koval A, Bullrich F, Gray D, et al. Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nurr77. *PNAS* 2001;98:3690-4.

Perkins ND. NF κ B: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol* 2004;14(2):64-9.

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

Puduvalli VK, Sampath D, Bruner JM, Nanglia J, Xu R, Lim H, et al. TRAIL-induced apoptosis in gliomas is enhanced by Akt-inhibition and is independent of JNK activation. *Apoptosis* 2005;10:233-43.

Ravi R, Bedi A. NF κ B in cancer- a friend turned foe. *Drug Resist Updates* 2004;7:53-67.

Rojo AI, Salinas M, Martín D, Perona R, Cuadrado A. Regulation of Cu/Zn superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor- κ B. *J Neurosci* 2004;24:7324-34.

Roland NJ, Caslin AW, Nash J, Stell PM. Value of grading squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head and Neck* 1992;14:224-9.

Romashkova JA, Makenov SS. NF- κ B is a target of Akt in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature* 1999;401:86-90.

Romero-Isart N, Vasak M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J Inorg Biochem* 2002;88:388-96.

Ross JS, Kallakury BVS, Sheehan CE, Fisher HAG, Kaufman RP, Scully S, et al. Expression of nuclear factor- κ B and I κ B α proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor- κ B immunoreactivity with disease recurrence. *Clin Cancer Res* 2004;10:2466-72.

Sakurai A, Hara S, Okano N, Kondo Y, Inoue J, Imura N. Regulatory role of metallothionein in NF- κ B activation. *FEBS Letters* 1999;455:55-8.

Santhi WS, Sebastian P, Varghese BT, Prakash O, Pillai MR. NF- κ B and COX-2 during oral tumorigenesis and in assessment of minimal residual disease in surgical margins. *Exper Mol Pathol* 2006;81:123-30.

Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med* 2005;34:129-33.

Sasabe E, Tatemoto Y, Li D, Yamamoto T, Osaki T. Mechanism of HIF-1 α -dependent suppression of hypoxia-induced apoptosis in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Sci* 2005;96:394-402.

Sato M, Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exper Med* 2002;196:9-22.

Schmitz KJ, Garbellus F, Callies R, Wohlschlaeger J, Otterbach, F, Shutz M, et al. Relationship and prognostic significance of phospho-(serine 166)-murine double minute 2 and Akt activation in node-negative breast cancer with regard to p53 expression. *Virchow Arch* 2006;448(1):16-23.

Schuchmann M, Galle PR. Dead or alive- NF κ B, the guardian which tips the balance. *J Hepatol* 2002;36:827-8.

Scully C, Field J, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head neck squamous cell carcinoma: carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000;36:256-63.

Shah A, Swain WA, Richardson D, Edwards J, Stewart DJ, Stonne C, et al. Phospho-Akt expression is associated with a favorable outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(8):2930-6.

She QB, Solit DB, Ye Q, O'Reilly KE, Lobo J, Miller K, et al. The Bad protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. *Clin Cancer Res* 2005;8:287-97.

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

Singhal S, Vachani A, Ozerkis D, Kaiser L, Albelda S. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res* 2005;11(11):3974-85.

Siriwardena BSMS, Tilakaratne A, Amaratunga EAPD, Tilakaratne WW. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. *Neoplasia* 2006;42:831-6.

Suh J, Rabson AB. NFkB Activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem* 2004;91:100-17.

Sundelin K, Jadner M, Norberg-Spaak L, Davidsson A, Hellquist HB. Metallothionein and fas (CD95) are expressed in squamous cell carcinoma of the tongue. *Eur J Cancer* 1997;1860-4.

Takada H, Tomizawa K, Matsushita M, Matsui H. 2-methoxyestradiol enhances p53 protein transduction therapy-associated inhibition of the proliferation of oral cancer cells through the suppression of NF-kB activity. *Acta Med Okayama* 2004;58:181-7.

Takamune Y, Ikebe T, Nagano O, Shinohara M. Involvement of NF-kB mediated maturation of ADAM-17 in the invasion of oral squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;365:393-8.

Tamatani T, Azuma M, Aota K, Yamashita T, Bando T. Enhanced Ikb kinase activity is responsible for the augmented activity of NF-kB in human head and neck carcinoma cells. *Cancer Letters* 2001;171:165-72.

Tamatani T, Azuma M, Motegi K, Takamaru N, Kawashima Y. Cepharanthin-enhanced radiosensitivity through the inhibition of radiation-induced nuclear factor kappaB activity in human oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007;31:761-8.

Tang JM, He QY, Guo RX, Chang XJ. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer* 2005;3:1-11.

Taniguchi T, Takahashi M, Shinohara F, Sato T, Echigo S, Fugita W, et al. Involvement of NF- κ B and mitochondrial pathways in docetaxel-induced apoptosis of human oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2005;15:667-73.

Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology* 2004;45:103-18.

Thornberry NA, Lasebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6.
 Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res* 2006;15:3963-6.

Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res.* 2006;15:3963-6.

Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res.* 2006;15:3963-6.

Trotman LC, Alimonti A, Scaglioni PP, Koutcher JA, Cordon-Cardo C. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature* 2006;441:523-7.

Tsujikawa K, Susuki N, Sagawa K, Itoh M, Sugiyama T. Induction and subcellular localization of metallothionein in regenerating rat liver. *Eur J Cell Biol* 1994;63:240-6.

Tsurutani J, Castillo SS, Brognard J, Granville CA, Zhang C, Lee D, et al. Tobacco components stimulate Akt-dependent proliferation and NF- κ B-dependent survival in lung cancer cells. *Carcinogenesis* 2005;26:1182-95.

Tsurutani J, Fukuoka J, Tsurutani H, Shih JH, Hewitt SM, Heller D, et al. Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small-cell lung cancer tumors. *Clin Oncol* 2006;24(2):306-14.

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

Vargas H, Pitman KT, Johnson JT, Galati LT. More aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the anterior tongue in young women. *Laryngoscope* 2000;110:1623-6.

Vasak M, Hasler DW. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Chem Biol* 2000;4:177-83.

Vazquez F, Sellers WR. The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochem Biophys Acta* 2000;1470:21-35.

Vestey SB, Sen C, Calder CJ, Perks CM, Pignatelli M, Grytf D, et al. Activated Akt expression in breast cancer: correlation with p53, Hdm2 and patient outcome. *Eur J Cancer* 2005; 41:1017-25.

Viglietto G, Motti ML, Fusco A. Understanding p27^{Kp1} desregulation in cancer. *Cell Cycle* 2002;1(6):394-400.

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

Waes CV, Chang AA, Lebowitz PF, Druzgal CH, Chen Z. Inhibition of nuclear factor- κ B and target genes during combined therapy with proteasome inhibitor bortezomib and reirradiation in patients with recurrent head neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2005;63:1400-12.

Warnakulasuriya S, Parkkila S, Nagao T, Preedy VR, Pasanen M, Heidi K, et al. Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia and cancer. *J Oral Pathol Med* 2008;37:157-65.

West KA, Brognard J, Clarck AS, Linnoila IR, Yang X. Rapid Akt activation by nicotine and tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest* 2003;111:81-90.

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

Yamamoto Y, Gaynor RB. I κ B kinases: key regulators of the NF κ B pathway. *Trends Biochem Sci* 2004;29 (2):72-9.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Control of apoptosis by NF- κ B pathway. *Cell* 1995;80:285-91.

Yao J, Duan L, Fan M, Wu X. NF- κ B signaling pathway is involved in growth inhibition, G2/M arrest and apoptosis induced by trichostatin A in human tongue carcinoma cells. *Pharmacol Res* 2006;54:406-13.

Yao J, Duan L, Fan M, Wu X. Y-secretase inhibitors exerts antitumor activity via down-regulation of notch and nuclear factor kappa B in human tongue carcinoma cells. *Oral Dis* 2007;13:555-63.

Yu Z, Weinberg PM, Sasaki C, Eggleston BL, Speier WF. Phosphorylation of Akt (Ser 473) predicts poor clinical outcome in oropharyngeal squamous cell cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2007;16:553-8.

Zhang H, Bajraszewski N, Wu E, Moseman HW, Dabora SL. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negative mTOR. *J Clin Invest* 2007;117:730-8.

Zhang P, Ostrander JH, Faivre E, Olsen A, Fitzsimmons D. Regulated association of protein kinase B/Akt with breast tumor kinase. *J Biol Chem* 2005;280(3):1982-91.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature Cell Biol* 2001;3:973-83.

Zhou Y, Castori S, Eppenberger U, Benz C. The NF κ B pathways and endocrine-resistant breast cancer. *Endocrine Related Cancer* 2005a;12:37-46.

Zhou Y, Castori E, Marx C, Yau C, Scott G. Activation of nuclear factor- κ B (NF κ B) identifies a high-risk subset of hormone-dependent breast cancers. *Int J Biochem Cell Biol* 2005b;37:1130-44.