KATIUCHIA UZZUN SALES

**ATIVAÇÃO E BLOQUEIO, DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO PI3K, EM
CÉLULAS CULTIVADAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE:
CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS AKT, B-
CATENINA, CICLINA D1 E PTEN**

São Paulo

2006

Katiuchia Uzzun Sales

Ativação e bloqueio, da via de sinalização do PI3K, em células cultivadas de carcinoma epidermóide: correlação com a expressão das proteínas Akt, β -catenina, Ciclina D1 e PTEN

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

2006

DEDICATÓRIA

Minha mãe, meu pai.

Catharina e Eurípides.

Amores.

Razão de minhas buscas, de meus objetivos.

Enorme apoio e incentivo diuturno.

Vocês iluminam minha vida.

Duas estrelas que brilham, permanentemente, transmitindo força e equilíbrio para a superação dos obstáculos.

Nathi e Higor, meus irmãos e amigos queridos. Somos um tripé e será sempre assim, independentemente dos diferentes rumos que as nossas vidas percorram. A solidariedade e o amor, que encontro em vocês, são irreproduzíveis em palavras....

"Grandes realizações são possíveis quando se dá importância aos pequenos começos." (Lao Tzu)

Tia Maria e tio Luiz (in memorian). São tios apenas no parentesco. Muito obrigada, mamãe e papai. Vocês foram e são muito importantes em minha vida.

Baba...é difícil encontrar palavras para descrevê-la! A vovó de espírito mais jovem que um neto pode ter. Minha grande conselheira! Minha grande amiga! Meu ídolo número 1!

Bárbara, minha prima ... minha primeira paciente de endodontia, de prótese e do consultório. Muito obrigada pela confiança depositada em mim sempre!

Felipe. Imenso respeito e consideração. A paz que irradia ilumina e contagia a todos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, muito obrigada pela companhia e acolhimento, da Iniciação Científica ao Doutorado. Muito obrigada pelos ensinamentos e, fundamentalmente, pelo importante amadurecimento que me proporcionou durante todos estes anos de convívio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ney Soares de Araújo e Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo, agradeço pelo apoio incondicional recebido durante esta etapa. Sua forma de ver e viver me contagia e estimula a superar meus próprios limites. Muito obrigada.

Gostaria de agradecer a oportunidade de estudar, aprender e trabalhar no NIH, oferecida pelo Dr. Thomas Bugge e Dr. Silvio Gutkind. Foram quatro meses de árduo trabalho, imensurável aprendizado e crescente amizade. Muito obrigada.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: Prof. Dra. Suzana C.O.M. Sousa, Prof. Dra. Andréa Mantesso, Profa. Dra. Marília Martins, Profa. Dra. Marina Magalhães, Prof. Dr. Fabio D. Nunes e Profa. Dra. Karem Ortega. Agradeço os ensinamentos transmitidos durante a rotina, os diferentes créditos e, mesmo, nas atribuições dos corredores de nossa Disciplina. Estavam, enfim, sempre solícitos, quando das minhas dúvidas e necessidades.

Aos funcionários da FOUSP que, com muita atenção e generosidade, me ajudaram por todos estes anos: Beatriz Costa, Edna Todai (*in memorian*), Elisa Santos, Nair Pereira, Néia Barbosa, Patrícia Leonel e Zilda Alves.

Agradeço ao Prof. Dr. Ruy Jaeger e Dra. Vanessa Freitas, pelo imenso auxílio prestado durante o desenvolvimento experimental desta tese, pela troca de idéias e de conhecimento. Muito obrigada.

Cristiane Squarize e Rogério Castilho. A vida dá muitas voltas, não é? Quem diria! Da Iniciação Científica, na USP, ao NIH! Muito obrigada pelo grande apoio que recebi durante esta trajetória, minha estada nos EUA e, principalmente, dentro do NIH.

Aos meus queridos colegas de Pós-Graduação. Verdadeiras amigas brotaram deste convívio. Muito obrigada! Foram amigos para comemorar, alertar e ajudar. Momentos compartilhados e inesquecíveis: Flávia Pontes, Sérgio Alves Júnior, Hélder Pontes, Márcia Campos, Camila Rodini, Tatiana Libório, Michelly Peruzetto, Paulo Brás, Thaís Acquafreda, Fabrício Passador, Nathalie Rezende, Marina Moura, Yonara Marques, Vanessa Romualdo, Adriano Candido, Alexander Salvoni, Alexandra Costa, Patrícia Ricardo, Sérgio Cury, Renata Acay, Flávia Xavier, Christiane Leite, Alexandre Fraige, Kívia Ferrazzo e Lineu Júnior.

Ainda, gostaria de lembrar a grande receptividade e os conhecimentos passados por todos aqueles do laboratório do PTRU/NIDCR/NIH (Protease and Remodelling Tissue Unit / National Institute of Dental and Craniofacial Research / National Institutes of Health): Roman Szabo, Karin List, Rebeca Miller and Brooke Currie. Com esta turma senti-me em casa!!!!

Fernanda Giudice: Procurei passar o meu melhor para você. Aprendi muito também. Sucesso!

Aos meus amigos de toda a vida. Aqueles que estão aí para o que der e vier. “....amigo é coisa para se guardar do lado esquerdo de peito, dentro do coração, assim falava a canção que na América ouvi....”: Alice Singer (Hélice), Andréia Perrella (Déia), Caio Gardelli, Carolina Venturole (Bim), Daniela Voltan (Dani), Danielle Silva (Tchuca), Eduardo Perez (Dú), Luiza Zonzini (Lú), Renata Gago (Re), Suzan Pantaroto (Sú) e Úrsula Mendonça (Ursinha). Amo muito todos vocês!!!!

Por derradeiro, gostaria de lembrar aquelas pessoas que, na travessia desta etapa, foram fundamentais no alívio do meu cansaço físico e emocional diário, quais sejam, Ricardo Santos e Alcides (Natação Master Competition), Allison (Natação YMCA), e Protease Bike Team (Thomas, Kenn e Dudley).

"Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho." (Mahatma Gandhi)

Sales KU. Ativação e bloqueio, da via de sinalização do PI3K, em células cultivadas de carcinoma epidermóide: correlação com a expressão das proteínas Akt, β -catenina, Ciclina D1 e PTEN [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é responsável por 90% das neoplasias malignas, nesta região. Molecularmente, inúmeras vias de sinalização, ainda não muito bem compreendidas, são responsáveis pelo seu crescimento e invasão para tecidos vizinhos, além de metástases para órgãos distantes. Este trabalho destinou-se a avaliar o crosstalk entre as vias de sinalização do Wnt e PI3K, quando células de carcinoma epidermóide (HN6 e HN31) e queratinócitos imortalizados (HaCat), foram estimulados com 50nM Wortmannin (metabólito fúngico que mimetiza a função da PTEN) e 10ng/ml EGF (fator de crescimento epitelial). Para isto, proteínas-chave, pertencentes a estas vias, foram localizadas e quantificadas no interior celular: PTEN, β -catenina, Akt, pAkt e Ciclina D1. As técnicas de imunofluorescência e western blot foram utilizadas, respectivamente, para observar a localização e os níveis destas proteínas, nos diferentes compartimentos celulares. Os resultados mostraram que a ativação da via do PI3K, pelo EGF, promoveu a proliferação celular, independentemente da via de sinalização do Wnt. Quando as células foram tratadas com wortmannin, houve depleção dos níveis citosólicos e totais de pAkt associada ao acúmulo citoplasmático de ciclina D1. Igualmente, não houve alteração nos níveis da proteína β -catenina. Ademais, detectou-se a presença de PTEN nuclear em todas as linhagens estudadas. Desta forma, estas células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, apresentaram mecanismos de bloqueio e de ativação da proliferação celular,

predominantemente, por atividade das proteínas PTEN (atividades citoplasmática e nuclear) e Akt, após o tratamento com wortmannin e EGF.

Palavras-Chave: carcinoma epidermóide, Akt, β -catenina, Ciclina D1, PTEN, Wortmannin e EGF.

Sales KU. Ativação e bloqueio, da via de sinalização do PI3K, em células cultivadas de carcinoma epidermóide: correlação com a expressão das proteínas Akt, β -catenina, Ciclina d1 e PTEN [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) represents 90% of all head and neck malignancies. Cancer growth, invasion and metastasis are due to several signaling pathways that, unfortunately, are not completely understood. The aim of this study was the crosstalk evaluation between PI3K and Wnt signaling pathways in two different HNSCC cell lines (HN6 and HN31) and HaCat cell line (immortalized keratinocytes), treated with 50nM wortmannin and 10ng/ml EGF (epidermal growth factor). Western blot and imunofluorescence were performed in order to analyze Wnt, PTEN and PI3K signaling key target proteins: PTEN, Akt, CyclinD1 and β -catenin. Results showed that β -catenin-independent cellular proliferation was promoted by PI3K signaling pathway EGF-dependent activation. After wortmannin treatment, correlation between decreased phospho-Akt levels and cytosolic cyclin D1 accumulation was found. Also, all cell lines exhibited nuclear PTEN activity. Taking these results together, we conclude that the Cyclin D1 positive and negative modulations, after EGF and wortmannin treatments, were due to, respectively, Akt and PTEN proteins.

Keywords: HNSCC, Akt, β -catenin, Cyclin D1, PTEN, Wortmannin and EGF.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Estimativa dos novos casos de neoplasias malignas em todo o território brasileiro, segundo o local de acometimento.....	24
Tabela 2.2 – Estimativa dos novos casos de neoplasias malignas, por estado, segundo o acometimento.....	25
Tabela 4.1 – Origem das linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço e sua classificação, segundo o critério TNM.....	57
Tabela 4.2 – Especificações técnicas dos anticorpos utilizados na técnica de wetern-blot.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Esquema dos eventos moleculares que acontecem durante a transformação de uma célula normal diferenciada em célula neoplásica.....	28
Figura 2.2 – Características adquiridas pelas células neoplásicas.....	29
Figura 2.3 – Esquema representativo da massa tumoral heterogênea a partir de células-tronco (stem cells).....	31
Figura 2.4 – Esquema da Via de Sinalização PI3K/Akt.....	35
Figura 2.5 – Estrutura da proteína PTEN.....	36
Figura 2.6 – Via de Sinalização da proteína PTEN.....	38
Figura 2.7 - Ilustração das formas fosforilada (inativa) e defosforilada (ativa) da proteína PTEN.....	40
Figura 2.8 – β -catenina: função e sinalização.....	46
Figura 2.9 – Via de Sinalização do Wnt.....	48
Figura 2.10 – Principais vias ativadas pelos receptores cerBs.....	51
Figura 2.11 – Progressão do ciclo celular.....	53
Figura 2.12 – Representação esquemática da regulação da ciclina D1.....	54
Figura 4.1 – Esquema do plaqueamento e tratamento das células, nas reações de imunofluorescência.....	59
Figura 4.2 – Esquema do plaqueamento e tratamento das células, nas reações de western blot.....	60
Figura 5.1 – Localização da proteína ciclina D1, nas linhagens HaCat, HN6 e HN31; segundo o tratamento celular realizado.....	75
Figura 5.2 – Níveis totais de ciclina D1 e sua localização, nas linhagens HaCat, HN6 e HN31; segundo o tratamento celular realizado.....	76

Figura 5.3 – Localização e quantificação da proteína β -catenina, nas linhagens HaCat e HN6, tratadas com wortmannin e EGF.....	77
Figura 5.4 – Localização e quantificação da proteína β -catenina, na linhagem HN31, tratada com wortmannin e EGF.....	78
Figura 5.5 – Quantificação das proteínas Akt / pAkt, nos diferentes compartimentos celulares.....	79
Figura 5.6 – Localização da proteína PTEN, nas linhagens HaCat, HN6 e HN31, segundo Via de Sinalização estimulada.....	80
Figura 5.7 – Localização da proteína PTEN, nas linhagens HaCat, HN6 e HN31, segundo Via de Sinalização estimulada.....	81
Figura 5.8 – Níveis totais e parciais (citossólico e nuclear) da proteína PTEN.....	82
Figura 6.1 – Esquema final, que sintetiza as questões propostas por este estudo.....	86
Figura 6.2 – Esquema da correlação tratamentos / ciclina D1 / pAkt.....	93
Figura 6.3 – Esquema final da Discussão.....	96

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 Carcinoma epidermóide.....	26
2.1.1 epidemiologia	26
<i>2.1.1.2 faixa etária.....</i>	<i>28</i>
<i>2.1.1.3 etiologia</i>	<i>29</i>
2.1.2 mecanismos moleculares do câncer.....	30
<i>2.1.2.1 iniciação tumoral a partir de células diferenciadas</i>	<i>30</i>
<i>2.1.2.2 iniciação tumoral a partir de células-tronco (stem cells)</i>	<i>32</i>
2.2 Via de sinalização PI3K/Akt.....	34
2.3 PTEN	38
2.3.1 estrutura da proteína PTEN	39
<i>2.3.1.1 PTEN: domínios - C2 e fosfatase</i>	<i>40</i>
<i>2.3.1.2 PTEN: sequência N-terminal e cadeia C-terminal</i>	<i>42</i>
2.3.2 SHIP	43
2.3.3 PTEN: alterações genéticas e expressão protéica no câncer	44
2.4 β-Catenina	46
2.4.1 β-catenina: estrutura da proteína	46
2.4.2 β-catenina: função e sinalização	47
<i>2.4.2.1 β-Catenina e Wnt</i>	<i>49</i>

2.4.2.2 <i>β-Catenina e EGF</i>	52
2.5 Ciclina D1	54
2.5.1 ciclinas: panorama geral	54
2.5.2 a ciclina D1	56
3 PROPOSIÇÃO	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1 Cultivo Celular.....	60
4.2 Imunofluorescência	64
4.3 Análise dos Resultados	64
4.4 Western blot	65
5 RESULTADOS	69
5.1 Proliferação celular: níveis totais de Ciclina D1 e sua localização segundo a via de sinalização estimulada	69
5.1.1 localização da proteína Ciclina D1 após estimulação da via de sinalização do EGF (imunofluorescência).....	69
5.1.2 localização da proteína Ciclina D1 após estimulação da via de sinalização do PTEN (imunofluorescência).....	70
5.1.3 níveis totais de Ciclina D1, após estimulação das vias de sinalização do PTEN e do EGF (western blot).....	70
5.2 Atividade antiproliferativa indireta exercida pela proteína PTEN	71
5.2.1 localização e quantificação da proteína b-Catenina nos diferentes compartimentos celulares: adesão ou efetiva participação na sinalização de proliferação?	71
5.2.1.1 <i>HaCat</i>	71
5.2.1.2 <i>HN6</i>	72

5.2.1.3 <i>HN31</i>	72
5.2.2 AKT/mTOR: provável mecanismo envolvido na sinalização de proliferação?	73
5.2.2.1 <i>quantificação celular total das proteínas Akt e pAkt nas linhagens HaCat, HN6, e HN31</i>	73
5.2.2.2 <i>quantificação citosólica das proteínas Akt e pAkt nas linhagens HaCat, HN6 e HN31</i> ...	74
5.2.2.3 <i>quantificação nuclear das proteínas Akt e pAkt nas linhagens HaCat, HN6 e HN31</i>	75
5.3 Atividade antiproliferativa direta exercida pela proteína PTEN	75
5.3.1 localização da proteína PTEN após a estimulação das células com EGF	75
5.3.2 localização da proteína PTEN após a estimulação das células com wortmannin	76
5.3.3 níveis celulares totais, da proteína PTEN, após os tratamentos com wortmannin e EGF	76
5.3.4 níveis citosólicos, da proteína PTEN, após os tratamentos com wortmannin e EGF	77
5.3.5 níveis nucleares, da proteína PTEN, após os tratamentos com wortmannin e EGF	77
6 DISCUSSÃO	86
6.1 Os tratamentos com EGF e Wortmannin promoveram, respectivamente, o aumento da transcrição e o acúmulo citoplasmático da proteína ciclina D1.	89
6.2 Atividade indireta do PTEN	92
6.2.1 β -catenina: efetiva participação na via de proliferação neoplásica?	92
6.2.2 correlação entre a expressão das proteínas Akt e pAkt	95
6.3 Atividade antiproliferativa por ação direta da proteína PTEN	97
7 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101
ANEXO A - Parecer de aprovação do comitê de ética em pesquisa	118

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas são responsáveis pela segunda maior taxa de mortalidade, no Brasil. Dentre elas, 3 a 5% são representados pelo câncer de cabeça e pescoço. Acrescente-se ainda, que o tratamento destas patologias, quando em estágios avançados, é dispendioso e não proporciona, muitas vezes, a cura para o paciente.

Assim, muitos esforços têm sido empregados, em vários sentidos, para abrandar esta realidade. Esforços estes, direcionados, tanto à descoberta de proteínas que funcionam como alvos terapêuticos, quanto ao melhor entendimento das vias de sinalização moleculares funcionantes durante a inicialização e progressão tumoral.

Entre estas proteínas, destaca-se a PTEN, conhecida supressora de tumor e moduladora intracelular da proteína Akt. Quando fosforilada, a Akt bloqueia inúmeras proteínas apoptóticas e a GSK-3 (indispensável para a degradação da β -catenina e Ciclina D1). Também ativa proteínas anti-apoptóticas e a quinase mTOR (mammalian target of Rapamycin), cuja responsabilidade é estimular a translação de proteínas responsáveis, entre outras funções, pela progressão celular da Fase G1 para a Fase S.

Importante proteína envolvida na Via de Sinalização do Wnt, a β -catenina possui a função de adesão celular, quando ligada a Caderina E e ao citoesqueleto. Entretanto, quando a β -catenina não é fosforilada, pelo GSK3- β (glicogen syntase kinase 3- β), não será adequadamente degradada. Desta forma, a β -catenina livre e não-degradada, acumula-se no citoplasma e é translocada para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes-alvo, como a ciclina D1.

Resultados previamente obtidos, no Laboratório de Biologia Celular da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, mostraram possível relação entre as Vias de Sinalização do Wnt e do

PTEN, devido a um padrão de expressão imunoistoquímico similar entre as proteínas β -catenina e PTEN, em biópsias de carcinoma epidermóide:

1) A perda da expressão da β -catenina, na membrana plasmática, e seu acúmulo, no citoplasma, estavam associados a uma superexpressão da ciclina D1 nuclear. Ainda, esta perda de expressão da β -catenina estava presente, com predomínio, nas frentes de invasão e ilhotas isoladas de células neoplásicas, no tecido conjuntivo¹.

2) SQUARIZE; CASTILHO; SANTOS PINTO JR. (2002) analisou a expressão da proteína PTEN. A sua perda de expressão foi encontrada nos casos menos diferenciados e nas frentes de invasão. Por outro lado, havia expressão desta proteína nos casos em que diferenciação histopatológica do tumor era maior.

Em adição, na Literatura, inúmeros estudos associam estas proteínas (β -catenina e PTEN) com a sinalização neoplásica em diferentes tumores, incluindo mama, cólon e cabeça e pescoço.

Sendo assim, esta tese foi idealizada, e inicialmente planejada, visando analisar a expressão das proteínas ciclina D1, β -catenina e PTEN, em células cultivadas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, sob tratamento do wortmannin (metabólico fúngico que mimetiza o funcionamento da proteína PTEN) e do EGF.

Posteriormente, adicionou-se a este estudo, a análise da expressão da proteína pAkt (participante da via de sinalização do PI3K), com a finalidade apenas de checar a correta ativação das vias do PTEN e do EGF, nas células cultivadas, já que a fosforilação do Akt é ativada pelo EGF e bloqueada pelo PTEN. Todavia, no decorrer dos experimentos, observou-se que esta proteína possuía um desempenho maior do que se vislumbrava, razão pela qual lhe foi dado o realce necessário.

¹ Sales KU; Santos Pinto Jr D (2003 – dados não publicados).

Por derradeiro, como instrumentos de pesquisa, utilizaram-se as técnicas de imunofluorescência, para a localização das proteínas no interior celular: ciclina D1, PTEN e β -catenina; e western-blot, para a quantificação das diferentes proteínas: β -catenina, ciclina D1, PTEN, Akt e pAkt, nos distintos compartimentos celulares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide

2.1.1 epidemiologia

Câncer de cabeça e pescoço é um termo coletivo baseado na localização anatômica, utilizado para descrever neoplasias malignas que ocorrem no trato aero-digestivo superior. Esta localização inclui boca, laringe e faringe. Cerca de 40% dos tumores de cabeça e pescoço acontecem na boca, 25% ocorrem na laringe e, finalmente, 15% são encontrados na faringe. Estes são seguidos por outros de menor acometimento como, por exemplo, a tireóide (DOBROSSY, 2005).

2.1.1.1 incidência

O carcinoma epidermóide representa mais de 90% das neoplasias de cabeça e pescoço, acometendo, aproximadamente, 500.000 novos casos/ano, no mundo. Apenas 34% deles são diagnosticados a tempo de proporcionar alguma terapia ou cura para o paciente (BSOUL, HUBER; TEREZHALMY, 2005; SUDBO, 2004; FRANCESCHI et al., 2000; CHEN et al., 2006).

Segundo Bsoul, Huber e Terezhalmay (2005), 1,2 pacientes morrem/hora, vítimas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, nos Estados Unidos da América.

O câncer de boca, no Brasil, é responsável por 10.060 novos casos/ano, em homens e, 3.410 novos casos/ano, em mulheres (INCA – www.inca.gov.br).

Tabela 2.1- Estimativa dos novos casos de neoplasias malignas em todo o território brasileiro, segundo o local de acometimento. (INCA, 2006)

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos		
	Masculino	Feminino	Total
Mama Feminina	-	48.930	48.930
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.850	9.320	27.170
Estômago	14.970	8.230	23.200
Colo do Útero	-	19.260	19.260
Próstata	47.280	-	47.280
Cólon e Reto	11.390	13.970	25.360
Esôfago	7.970	2.610	10.580
Leucemias	5.330	4.220	9.550
Cavidade Oral	10.060	3.410	13.470
Pele Melanoma	2.710	3.050	5.760
Outras Localizações	61.530	63.320	124.850
Subtotal	179.090	176.320	355.410
Pele não Melanoma	55.480	61.160	116.640
Todas as Neoplasias	234.570	237.480	472.050

Segundo o INCA, aproximadamente um terço destes novos casos devem acontecer no Estado de São Paulo (4.330 acometimentos), no ano de 2006.

Tabela 2.2- Estimativa dos novos casos de neoplasias malignas, por estado, segundo o acometimento (INCA, 2006)

Estados	Leucemias	Cavidade Oral	Pele Melanoma	Outras Localizações	Subtotal	Pele não melanoma	Todas as Neoplasias
Acre	20	20	20	160	500	140	640
Alagoas	110	110	20	900	2.330	790	3.120
Amapá	20	20	10	180	530	170	700
Amazonas	140	70	20	1.050	3.190	1.130	4.320
Bahia	390	700	100	4.610	13.640	4.680	18.320
Ceará	350	400	100	2.140	9.610	6.170	15.780
Distrito Federal	120	140	70	1.920	4.590	1.100	5.690
Espírito Santo	180	320	110	2.710	7.100	1.590	8.690
Goiás	270	290	90	1.920	7.370	4.110	11.480
Maranhão	150	60	20	1.240	3.280	970	4.250
Mato Grosso	120	90	30	1.070	3.390	1.680	5.070
Mato Grosso do Sul	120	150	50	1.610	4.480	1.430	5.910
Minas Gerais	970	1.030	380	14.580	35.580	9.430	45.010
Pará	220	180	30	1.280	4.870	2.010	6.880
Paraíba	130	130	30	880	2.580	1.270	3.850
Paraná	610	1.080	510	8.990	25.680	7.960	33.640
Pernambuco	360	470	100	3.840	12.120	5.500	17.620
Piauí	100	60	20	340	2.050	1.400	3.450
Rio de Janeiro	1.020	2.050	510	16.930	46.180	11.300	57.480
Rio Grande do Norte	150	160	40	660	3.030	2.400	5.430
Rio Grande do Sul	860	1.020	780	15.810	40.050	9.650	49.700
Rondônia	40	50	20	530	1.490	800	2.290
Roraima	20	20	20	270	510	0	510
Santa Catarina	380	420	500	2.720	11.530	7.240	18.770
São Paulo	2.570	4.330	2.140	36.800	105.840	32.730	138.570
Sergipe	80	80	20	950	2.330	620	2.950
Tocantins	50	20	20	760	1.560	370	1.930
Brasil	9.550	13.470	5.760	124.850	355.410	116.640	472.050

2.1.1.2 faixa etária

A incidência do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço aumenta com a idade. Cerca de 96% dos pacientes portadores desta neoplasia possuem mais que 40 anos. No entanto, durante as últimas décadas, tem-se notado o aumento da ocorrência em pessoas mais jovens (DOBROSSY, 2005).

Em adição, a incidência desta patologia é maior no sexo masculino, quando comparado ao feminino. De acordo com o INCA, no Brasil, a proporção da incidência entre homens e mulheres é de, aproximadamente, 3:1.

2.1.1.3 etiologia

Com relação aos fatores etiológicos, o cigarro é a principal causa em absoluta maioria dos pacientes portadores desta neoplasia. Na União Européia, cerca de 60% dos carcinomas de cabeça e pescoço que ocorrem em homens e 30% daqueles que ocorrem em mulheres, são atribuídos única e exclusivamente ao uso do cigarro. Entretanto, o risco deste carcinoma aumenta mais de 15 vezes quando o uso do tabaco é associado ao etilismo (BRAY et al., 2002).

Segundo o INCA (www.inca.gov.br), no Brasil:

“Apenas 20% dos cânceres estão ligados à hereditariedade. O fumo é o maior causador da doença com grande incidência nos pulmões, cabeça e pescoço. Em segundo lugar, vem a má alimentação, associada ao consumo em excesso de gordura animal”.

Carvalho et al. (2004) observaram a associação de 88,1% da incidência de carcinoma epidermóide de boca com o uso do tabaco, nos pacientes do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer AC Camargo. Este mesmo estudo aponta uma comparação entre os pacientes de duas instituições localizadas em países com diferentes graus de desenvolvimento: Centro de

Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer AC Camargo (Brasil) e Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (EUA). A conclusão foi de que os pacientes do Brasil apresentaram um prognóstico mais pobre, decorrente do atraso no diagnóstico da doença. No entanto, após o controle do estágio do tumor, a evolução do tratamento foi muito parecida (CARVALHO et al., 2004).

2.1.2 mecanismos moleculares do câncer

Os mecanismos moleculares do câncer são postulados de duas diferentes maneiras.

2.1.2.1 iniciação tumoral a partir de células diferenciadas

A primeira delas compreende uma série de eventos genéticos de causa multifatorial, que ocorre em células inicialmente normais e diferenciadas.

De forma geral, as células normais sofrem agressões advindas do meio ambiente e são danificadas sem serem adequadamente reparadas, por disfunções existentes em seus genes de reparo, conhecidas como predisposição genética (HANAHAAN; WEINBERG, 2000; COTRAN; ROBBINS; KUMAR, 1994).

Destarte, acontece a ativação de proto-oncogenes em oncogenes e a inativação dos genes supressores de tumor, levando à produção de células mutadas e com potencial neoplásico (HANAHAN; WEINBERG, 2000; COTRAN; ROBBINS; KUMAR, 1994) (Figura 2.1).

Em continuidade a estes eventos, ocorre uma expansão clonal caracterizada por proliferação destas células mutadas. Durante a expansão clonal, acontecem inúmeras outras mutações devido à desregulação dos mecanismos de proliferação e diferenciação celulares. Assim, a massa neoplásica adquire uma característica heterogênea e individual (HANAHAN; WEINBERG, 2000; COTRAN; ROBBINS; KUMAR, 1994) (Figura 2.1).

Figura 2.1- Esquema dos eventos moleculares que acontecem durante a transformação de uma célula normal diferenciada em célula neoplásica. Estas células sofrem expansão clonal com diversas mutações adicionais, que são responsáveis pela heterogeneidade das diferentes neoplasias. (Adaptado de COTRAN; ROBBINS; KUMAR,, 1994)

Em consequência, estas células neoplásicas adquirem seis características aberrantes, que lhe proporcionam um crescimento ilimitado e a possibilidade de invasão tecidual com formação de metástases à distância, independentemente dos sinais emitidos pelo hospedeiro. (Figura 2.2).

Figura 2.2 - Características adquiridas pelas células neoplásicas: Evasão a apoptose, insensibilidade a sinais anti-crescimento, invasão tecidual e metástase, ilimitado potencial de replicação e angiogenese sustentada. (Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2000)

2.1.2.2 iniciação tumoral a partir de células-tronco (stem cells)

Julius Cohnheim, em 1867, propôs que as neoplasias são derivadas de restos celulares embrionários e não de tecidos adultos normais.

Atualmente, referida hipótese é reconsiderada pela sociedade científica em relação às neoplasias malignas (REYA et al., 2001; HUNTLY; GILLILAND, 2005; ZHANG; ROSEN, 2006).

Segundo esta conjectura, ocorreriam mutações capazes de iniciar uma neoplasia em tipos celulares apropriados. As células-alvo destas mutações, que gerariam um tumor, seriam aquelas com maior potencial proliferativo e características semelhantes às células-tronco (REYA et al., 2001).

As células mutadas (cancer stem cells = células-tronco neoplásicas) dariam origem a células-filhas, tanto idênticas (imortalizadas e indiferenciadas), como não-imortalizadas e com grande atividade proliferativa. Estas células-tronco neoplásicas estariam num estado predominantemente quiescente e seriam as responsáveis por conferir a resistência da neoplasia em relação aos agentes quimioterápicos (LI; XIE, 2005) (Figura 2.3).

Igualmente, subpopulações de células tumorais, com características de células-tronco, foram identificadas em neoplasias de mama, próstata, melanoma, entre outros (AL-HAJJ et al. 2003; FANG et al., 2005; COLLINS et al., 2005). Ademais, autores afirmam que as células normais diferenciadas não seriam capazes de sobreviver tempo suficiente para receber as mutações necessárias e tornarem-se malignas (CAIRNS, 1975; HOUGHTON et al., 2006).

Independentemente da origem do tumor (células-tronco ou diferenciadas), as células mutadas resultantes adquirem características moleculares que as assemelham às células-tronco. Por esta razão, são chamadas de *stem-cell-like cells* (células com características de células-tronco) (JANZEN; SCADDEN, 2006).

Trabalhos realizados com modelo animal e células-tronco da medula óssea, revelam atividade anti-neoplásica e preventiva da proteína PTEN em relação ao desenvolvimento de leucemias (ZHANG et al., 2006; YILMAZ et al., 2006).

Figura 2.3 - Esquema representativo da massa tumoral heterogênea a partir de células-tronco (*stem cells*). (Adaptado de HOUGHTON et al., 2006)

2.2 Via de sinalização PI3K/Akt

A sinalização, através da via da PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-signaling pathway) (Figura 2.4), tem início com a ativação de receptores tirosino-quinases, em resposta a fatores de crescimento como, por exemplo, o EGF (MORGENSZTERN; MCLEOD, 2005). A ativação do PI3K é subsequente e acontece após a ligação do seu domínio SH2 (homólogo a Src),

da subunidade regulatória p85, a específicos resíduos fosfo-tirosinos, do receptor de membrana, ativados pelo fator de crescimento. Esta ligação permite o recrutamento da subunidade catalítica p110, para a membrana plasmática, com conseqüente ativação da PI3K (CANTLEY, 2002).

Depois de ativada, a PI3K atua como uma quinase lipídica, adicionando um grupo fosfato à posição D3-OH (posição D3 do anel de inositol), presente em fosfoinosítídeos da camada interna da membrana plasmática. Como resultado, converte fosfatidilinositol (PI)-4-fosfato e PI-4,5-bifosfato (PIP2) em PI-3,4-bifosfato e PI-3, 4,5-trifosfato (PIP3), respectivamente (FRESNO VARA et al., 2004).

Importante anotar que PI3K recruta proteínas, nas quais está presente o domínio homólogo à pleckstrin (PH), para a membrana plasmática. Incluem-se entre estas, as serino/treonina quinases Akt (ou PKB – protein kinase B) e PDK-1 (protein-dependent kinase-1) (FRESNO VARA et al., 2004).

A proteína Akt é também denominada PKB, por manter algumas similaridades, em seu domínio catalítico, com as proteínas quinases A (PKA) e C (PKC). A sua estrutura protéica é formada por uma cadeia N-terminal (domínio homólogo a pleckstrin), um domínio catalítico e uma cadeia C-terminal. Foram isolados 3 membros desta família (Akt1, Akt2 e Akt3), que são codificados por diferentes genes, possuindo mais de 80% de similaridade entre suas cadeias de aminoácidos. Parece ser, predominantemente, a ativação da proteína Akt1 (fosforilação nos sites: Thr-308 e Ser-473) que está relacionada com a proliferação e progressão tumoral, em diferentes tipos de neoplasias (NICHOLSON; ANDERSON, 2002).

Após ser recrutada para a membrana plasmática, a proteína Akt liga-se ao PIP3, sofrendo mudanças conformacionais, que permitem a sua fosforilação no resíduo Thr-308 (localizado no domínio catalítico), pela PDK-1. Fosforilação adicional e subsequente, no resíduo Ser-473

(localizado na cadeia C-terminal), por mecanismo ainda não identificado, permite a completa ativação da proteína Akt (NICHOLSON; ANDERSON, 2002).

A proteína Akt regula inúmeras proteínas-alvo envolvidas no controle da apoptose e proliferação celular:

1) Akt promove sobrevivência celular através:

- da inibição (fosforilação) da atividade pró-apoptótica de BAD, caspase-9 e família forkhead.

- ativação (aumento na transcrição) de inúmeros substratos anti-apoptóticos, incluindo I κ B kinase (IKK) e cAMP response element binding protein (CREB) (DATTA, BRUNET; GREENBERG, 1999).

2) Akt promove proliferação através da:

- inibição da glycogen synthase kinase 3- β (GSK3- β), responsável entre outras funções, pela estabilização citoplasmática da β -Catenina.

- supressão (fosforilação) de proteínas inibidoras do ciclo celular p21 e p27 (CHANG et al., 2003; LIANG; SLINGERLAND, 2003).

- ativação da mTOR (mammalian target of rapamycin). Trata-se de uma serina/treonina quinase responsável por controlar o crescimento e a proliferação celular, em resposta à disponibilidade de nutrientes e à estimulação por fatores de crescimento (HARDING, 2003). Os mais importantes alvos do mTOR parecem ser a S6K1 (translational components ribosomal p70S6 kinase), o 4E-BP1 [eukariotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1] e o fator de transcrição CREB. Enquanto a ativação de S6K1 aumenta a translação do RNAm, que contém TOP (5'-terminal oligopiramide tract), a fosforilação de 4E-BP permite a liberação de eIF4E, que facilita a ligação do RNAm à subunidade ribossômica 40S. Desta forma, mTOR estimula a

translação protéica, que é requerida para a progressão do ciclo celular. (HAY & SONENBERG, 2004).

A via PI3K /Akt é inativada pela degradação do PIP3, que é mediada por dois diferentes tipos de fosfatases: SHIP (*SH2-containing inositol phosphatase*) e PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*). SHIP defosforila PIP3, na posição D5, reduzindo-o a PI3, 4-bifosfato. A PTEN antagoniza diretamente a PI3K, através da remoção do grupo fosfato na posição D3, convertendo o PIP3 ao seu substrato original, o PI4, 5-bifosfato. (CANTLEY; NEEL, 1999; DAMEN et al., 1996). A diminuição da ativação da via do PI3K reduz, rapidamente, os níveis de fosforilação (tanto no resíduo Thr 308, quanto no resíduo da Ser473), da proteína Akt (NICHOLSON; ANDERSON, 2002).

O gene PTEN é freqüentemente silenciado, nas neoplasias malignas, devido a mutações ou deleções, levando à ativação constitutiva do AKT e à regulação positiva do m-TOR (CANTLEY; NEEL, 1999).

Figura 2.4 - Esquema da Via de Sinalização PI3K/Akt (MORGENZTERN; MCLEOD, 2005)

2.3 PTEN

O gene supressor de tumor PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) está localizado no cromossomo 10q23. Outras nomenclaturas utilizadas para se referir a este mesmo gene são MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers) e TEP-1 (TGFβ-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase) (LI; SUN, 1997; LI et al., 1997; STECK et al., 1997).

A proteína PTEN é formada por 403 aminoácidos e pertence à família das proteínas tirosino-fosfatases (PTP). Funcionalmente, atua tanto como uma fosfatase protéica, quanto uma fosfatase lipídica (CANTLEY; NEEL, 1999; MAEHAMA; TAYLOR; DIXON, 2001; VAZQUEZ; SELLERS, 2000).

2.3.1 estrutura da proteína PTEN

A análise da estrutura cristalina da proteína PTEN revela a presença de uma sequência N-terminal, associada ao domínio fosfatase, seguido do domínio C2, associado à cadeia C-terminal (LEE et al., 1999) (Figura 2.5).

Figura 2.5 - Estrutura da proteína PTEN

2.3.1.1 PTEN: domínios - C2 e fosfatase

A unidade catalítica da proteína é formada pelo domínio C2 e pelo domínio fosfatase, visto que com apenas estes dois domínios, a PTEN é capaz de metabolizar o PIP3, na membrana plasmática (VAZQUEZ; SELLERS, 2000; LEE et al., 1999).

A expressão apenas do domínio C2, na ausência do domínio fosfatase, é capaz de suprimir a motilidade celular (RAFTOPOULOU et al., 2004). Isto mostra que além da supressão tumoral proporcionada pela unidade catalítica da proteína, há um segundo mecanismo, que está envolvido na motilidade celular, e explica a possível atividade da PTEN na supressão de metástases.

Com relação ao domínio fosfatase, uma das funções de sua atividade protéica parece ser a defosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina de peptídeos fosforilados envolvidos na regulação da adesão e espalhamento celular (MEYERS; TONKS, 1997; TAMURA et al., 1998). Quando sua expressão intracelular está aumentada, a PTEN defosforila a quinase de adesão focal (FAK) e o domínio protéico Shc, diminuindo o espalhamento e a motilidade celulares (TAMURA et al., 1999; GU et al., 1999; TAMURA et al., 1998).

A atividade protéica do domínio fosfatase da PTEN, na supressão tumoral, ainda não está clara. Entretanto, esta atividade parece ser mantida nas linhagens mutadas do PTEN, em inúmeras neoplasias (FURNARI; HUANG; CAVENEE, 1998; MYERS et al., 1998; RAMASWAMY et al., 1999). Esta circunstância sugere que a atividade protéica, do domínio fosfatase, não é suficiente para bloquear o desenvolvimento tumoral. Sendo este bloqueado, principalmente, pela atividade lipídica do domínio fosfatase, desta proteína.

De outra forma, atividade lipídica do domínio fosfatase da proteína PTEN defosforila a posição D3 do anel de inositol do PtdIns-3,4-P₂ (PIP2) e do PtdIns-3,4,5-P₃ (PIP3), produtos da atividade quinase lipídica da PI3K (MAEHAMA, TAYLOR; DIXON, 2001; SEMINARIO; WANGE, 2003) (Figura 2.6). No entanto, parece ser o PIP3 o substrato fisiológico mais importante de defosforilação da proteína PTEN (MCCONNACHIE et al., 2003). Desta forma, a PTEN antagoniza a sinalização proporcionada pela via da PI3K. Inclusive, células que exibem menor quantidade da PTEN possuem um aumento na quantidade de PIP3 (STAMBOLIC et al., 1998; SUN et al., 1999).

Figura 2.6 – Via de Sinalização da proteína PTEN. PTEN, como gene supressor de tumor, defosforila PIP3 (produto da PI3K). O efeito *downstream* desta via de sinalização é o bloqueio da oncoproteína AKT. A proteína PTEN também defosforila a quinase de adesão focal (FAK) e o domínio protéico Shc, diminuindo o espalhamento e a motilidade celulares. (BIOCARTA – www.biocarta.com)

2.3.1.2 PTEN: sequência N-terminal e cadeia C-terminal

A sequência N-terminal contém um sítio polibásico, que tem um papel importante, tanto na ligação da PTEN a vesículas aniônicas, quanto no aumento da atividade da proteína (WALKER et al., 2004).

A cadeia C-terminal possui o sítio de ligação para proteínas que contém o domínio PDZ. A fosforilação de um grupo composto de resíduos de serina e treonina (Ser370, Ser380, Thr382, Thr383 e Ser385), dentro desta cadeia, é necessária para manter-se a estabilidade protéica da Pten (ADEY et al., 2000; GEORGESCU et al., 2000; VAZQUEZ et al., 2000; TOLKACHEVA et al., 2001).

Desta forma, quando a proteína PTEN é fosforilada, pela CK2 (casein kinase 2), encontra-se numa conformação monomérica “fechada” e inativada. A defosforilação, por sua vez, torna a proteína conformacionalmente “aberta” e com alta afinidade para complexos protéicos que contém o domínio PDZ (Figura 2.7). No entanto, a defosforilação é acompanhada da susceptibilidade, desta proteína, à digestão de proteases, *in vitro*, devido à sua baixa estabilidade nesta conformação (VAZQUEZ et al., 2001; DAS; DIXON; CHO, 2003).

Estes complexos protéicos PDZ parecem estar crucialmente envolvidos, durante a localização da proteína PTEN, na membrana plasmática, para que a mesma possa atuar sobre seus substratos (VAZQUEZ et al., 2000; WU et al, 2000). Demonstrou-se, através da análise de ressonância da superfície de membranas, que a interação entre a PTEN e a superfície lipídica era maior quanto mais aniônica fosse a superfície. Também, que a ligação ótima da proteína à membrana, requeria algumas áreas de caráter básico, encontradas dentro dos domínios fosfatase e C2 (DAS, DIXON; CHO, 2003).

Figura 2.7 - Ilustração das formas fosforilada (inativa) e defosforilada (ativa) da proteína PTEN

Outra forma de inativação da PTEN seria através da oxidação por stress. Produção endógena de espécies de oxigênio reativo alteraria a estrutura final da proteína PTEN, que se assemelharia à sua conformação fosforilada e inativa (LEE et al., 2002).

A maioria da PTEN celular parece ser mantida na sua forma inativa e fosforilada.

Ainda não se conhece a via de defosforilação da PTEN. Existe a possibilidade de ocorrer uma auto-defosforilação, no resíduo Thr 383, por sua própria atividade de fosfatase, já que proteínas mutantes e com o domínio fosfatase inativo, são encontradas mais altamente fosforiladas do que aquelas não-mutadas (RAFTOPOULOU et al., 2004; BIRLE et al., 2002).

2.3.2 SHIP

Outras fosfatases, como a SHIP (SH2 domain-containing inositol phosphatase), parecem estar também envolvidas na regulação de PIP3, através da defosforilação, na posição 5 do anel de inositol. No entanto, estas fosfatases não influenciam os níveis basais de PIP3. Células, na ausência de estímulo e com perda da expressão de SHIP, não apresentam elevado nível basal de PIP3. Esta situação é comumente encontrada em células ausentes de PTEN.

Entretanto, células com perda do SHIP apresentam elevação no intervalo de tempo e na magnitude dos estímulos, que levam à produção de PIP3 (STAMBOLIC et al., 1998; SUN et al., 1999; HELGASON et al., 2000; LIU et al., 1999; MALBEC et al., 2001; HAAS-KOGAN et al., 1998; AMAN et al., 1998).

2.3.3 PTEN: alterações genéticas e expressão protéica no câncer

Mutações, em um dos alelos, na linha germinativa do gene PTEN, que geram diminuição da expressão da proteína correspondente, têm sido reportadas na Síndrome de Cowden (CD). Esta síndrome é caracterizada pelo desenvolvimento de hamartomas. Pacientes com CD também possuem predisposição para o desenvolvimento de cânceres de mama e tireóide (NELEN et al., 1997; LIAW et al., 1997).

O PTEN está freqüentemente inativado em neoplasias humanas de tecidos variados, que incluem carcinomas de endométrio e glioblastomas (ALI; SCHRIML; DEAN, 1999; BONNEAU; LONGY, 2000). Os eventos de inativação mais comuns são as translocações, mutações missenses e deleções homozigóticas (ALI; SCHRIML; DEAN, 1999). Mutações intra-

gênicas, no gene do PTEN, podem ser identificadas em 60% das linhagens celulares de glioblastomas primários (LI et al., 1997; STECK et al., 1997).

No câncer de próstata, a perda da heterozigose, no intervalo 10q23, é encontrada entre 18 e 65% das neoplasias (RAMASWAMY et al., 1999). Ademais, a proteína PTEN está ausente em 20% dos espécimes de neoplasia primária, quando estudados pela técnica de imunoistoquímica. Esta ausência se correlaciona com o estadiamento avançado da mesma neoplasia (MCMENAMIN et al., 1999). Assim, a perda do PTEN parece estar envolvida com o desenvolvimento de formas mais agressivas e letais do câncer de próstata.

Mutações do PTEN ocorrem em 30-50% dos cânceres de endométrio, principalmente no subtipo endometrióide (YOKOMIZO et al., 1998). Da mesma forma, o PTEN encontra-se mutado em 24% dos cânceres de ovário. Esta alteração está presente com maior frequência, novamente, no tipo endometrióide (OBATA et al., 1998; YOKOMIZO et al., 1998). Em contraste com outras neoplasias, as mutações que levam à perda de função do PTEN, são mais comuns em estágios precoces, no ovário. Nesta neoplasia, o PTEN parece ter um papel na transformação neoplásica inicial (LEVINE et al., 1998; MAXWELL et al., 1998).

Em 30-40% dos melanomas, o gene PTEN encontra-se mutado (GULDBERG et al., 1997; TSAO et al., 1998). Ademais, em instantes específicos, encontrar-se-ão mutações do PTEN em locais de metástase, mas não na correspondente neoplasia primária. Isto sugere, novamente, o envolvimento do PTEN na progressão neoplásica (GULDBERG et al., 1997).

Segundo Squarize, Castilho e Santos Pinto Jr (2002), em tecidos parafinados de carcinoma epidermóide de boca, houve uma íntima relação entre a diferenciação da neoplasia e a expressão imunoistoquímica da proteína PTEN. Sendo que os casos, com maior diferenciação histopatológica, mostraram maior positividade para a PTEN, quando comparados aos casos mistos. Aqueles pouco diferenciados, por sua vez, foram negativos para a mesma proteína.

Em câncer de língua, LEE et al. (2001) não encontraram relação entre expressão imunoistoquímica da PTEN e grau histológico da neoplasia, estágio clínico ou envolvimento nodal. No entanto, a sobrevida dos pacientes foi estatisticamente maior, nos casos onde houve positividade para a PTEN, no exame imunoistoquímico.

Finalmente, segundo CHEN et al. (2000), a deleção homozigótica do gene PTEN não foi uma característica encontrada em carcinoma de boca.

2.4 β -Catenina

A β -Catenina foi originalmente isolada em associação ao domínio citoplasmático da Caderina E, uma proteína transmembrânica envolvida na adesão celular (OZAWA; BARIBAUT; KEMLER, 1989). Seu nome vem da palavra latina *catena*, que significa cadeia, devido à sua provável ancoragem ao citoesqueleto (OZAWA; RINGWALD; KEMLER, 1990).

2.4.1 β -catenina: estrutura da proteína

Estruturalmente, é formada por três domínios: domínio N-terminal, composto de 150 aminoácidos; domínio central, composto de 550 aminoácidos e, domínio C-terminal, formado por 100 aminoácidos.

O domínio N-terminal contém os sítios de ligação para a α -Catenina e para a GSK3- β . A região central funciona como um domínio de ligação a várias proteínas como LEF/TCF, APC, axina e Caderina E (RUBINFELD et al., 1995; HULSKEN; BIRCHMEIER; BEHRENS, 1994).

Finalmente, o domínio C-terminal, é altamente ácido e parece ser essencial para a coativação transcricional com o LEF/TCF, entre outras proteínas transcricionais (HECHT et al., 1999).

2.4.2 β -catenina: função e sinalização

A β -Catenina existe em duas diferentes formas intra-celulares: ligada à membrana citoplasmática, como parte do complexo da junção aderente, ou na forma citoplasmática (MORIN, 1999).

Quando presente na junção aderente intercelular, a β -Catenina liga-se, tanto ao domínio citoplasmático da proteína transmembrânica da Caderina E (adesão molecular homotípica Ca^{2+} dependente), quanto à amina terminal da α -Catenina, que promove sua ligação com os microfilamentos de actina do citoesqueleto.

Em sua forma citoplasmática, quando se apresenta dissociada dos componentes do complexo aderente, a β -Catenina é degradada ou translocada para o núcleo, de acordo com a via de sinalização ativada (MCCREA; BRIEHER; GUMBINER et al., 1993) (Figura 2.8). As vias de relevância, para o presente estudo, são as do Wnt e do EGF.

Ademais, a β -Catenina está implicada na angiogênese, através da regulação positiva do VEGF A (vascular endothelial growth factor A) (ILAN; TUCKER; MADRI, 2003).

Por fim, a degradação da β -Catenina envolve a sua ligação a um complexo constituído pelas proteínas APC (adenomatous polyposis coli), GSK-3 β (glycogen syntase kinase-3 β) e axina. A GSK-3 β fosforila os resíduos Thr-41, Ser-37 e Ser-33. O resíduo Ser-45 é previamente fosforilado pela CK-1 (casein kinase-1) e, em seguida, pela GSK-3 β . Estes eventos são passos cruciais para a ligação da β -Catenina à β -TrCP (β -transducing repeat-containing protein) e subsequente ubiquitinação e degradação via proteossomo (LIU et al., 2002; AMIT et al., 2002; LIU et al., 1999; YOST et al., 1996).

Mutações no gene que codifica a β -Catenina (CTNNB1) podem contribuir para seu acúmulo no núcleo. As mais comuns interferem nos resíduos de serina e treonina, dificultando sua fosforilação pelo GSK-3 β (SPARKS et al., 1998).

Nenhuma mutação no gene do GSK-3 β foi encontrada em neoplasia humana (CUI et al., 2003; POLAKIS, 1999). Isto pode significar a importância do GSK-3 β , na sinalização intracelular, e que sua ausência não é compatível com a viabilidade celular (LEIS et al., 2002).

Figura 2.8- β -Catenina: função e sinalização. A β -Catenina se liga a E-caderina e via α -Catenina à actina do citoesqueleto para formar as junções aderentes. β -Catenina livre citoplasmática é sequestrada pelo complexo composto pelo APC, Axina e GSK-3 β que fosforila (P) a β -Catenina. A β -TrCP media a ubiquitinação e a degradação pelos proteossomos da β -Catenina. Em resposta a diferentes vias de sinalização, ocorre inibição da fosforilação da β -Catenina, levando ao aumento da quantidade de β -Catenina livre no citoplasma, sendo esta translocada para o núcleo, onde se liga a fatores de transcrição (LEF/TCF) que estimulam a transcrição dos genes-alvo

2.4.2.1 β -Catenina e Wnt

Assim que a proteína transmembrânica Frz, associada a correceptores LRP (WEHRLI et al., 2000), recebe o Wnt-ligante, a proteína citoplasmática Dishevelled (Dvl) é recrutada para a membrana. Como resultado da fosforilação desta, pela proteína Frz, acontece a inativação do

complexo multiprotéico, formado pela axina, APC e GSK3- β , através da ligação da Dvl fosforilada à Axina. Este complexo protéico inativado é, assim, incapacitado de degradar a β -Catenina (BOUTROS et al., 2000, SMALLEY; DALE, 1999; LI et al. 1999) (Figura 2.9).

A β -Catenina livre citoplasmática e não-degradada, é translocada para o núcleo onde se liga com fatores de transcrição da família do LEF/TCF (T-cell factor / lymphoid enhance factor), transformando-os de repressores a ativadores transcricionais. A β -Catenina / LEF / TCF interage, previamente, com o BCL9-2, através da fosforilação do resíduo de tirosina Y142, da β -Catenina, para a posterior ativação dos genes-alvo de transcrição, como a ciclina D1 (KORINEK et al., 1997; BEHRENS et al., 1996; MOLENAAR et al., 1996; BREMBECK et al., 2004; KRAMPS et al., 2002).

Entretanto, quando a sinalização do Wnt desaparece, a β -Catenina é removida do núcleo, pela APC, sendo subsequenteemente degradada pela GSK3- β . Na ausência da β -Catenina nuclear, o LEF-TCF funciona como um repressor transcricional, em consequência do recrutamento de co-repressores transcricionais, como o CtBp (BIENZ, 2002; BRANNON et al., 1999).

Mutações no gene APC podem ser responsáveis por inapropriada ativação do TCF-4 (membro da família do LEF-TCF) e estão associadas ao aumento da cripta do intestino, *in vivo*. O TCF-4 possui grande relevância nos estudos de câncer de cólon e reto (BIENZ; CLEVERS, 2000).

Mutações no gene da Axina também podem levar a uma desregulação da via de sinalização do Wnt. Dois genes que codificam a Axina foram isolados em seres humanos, Axina 1 e Axina 2. Satoh e colaboradores descreveram, recentemente, mutação non-sense no gene da Axina 1, em carcinomas hepatocelulares (SATO et al. 2000). LIU et al. (2000) demonstraram a translocação na Axina 2 em 11, de 45 cânceres, de cólon e reto. Além do mais, mutações no gene

que codifica a proteína axina, resultam na eliminação dos sítios de ligação para o Dsh ou GSK-3 β , levando ao acúmulo nuclear da β -Catenina (LIU et al., 2000; WEBSTER et al., 2000).

Recente dado sugere que p53 pode reduzir a expressão de β -Catenina através de uma via independente da degradação clássica da β -Catenina, a chamada degradação Siah-mediado. Assim, mutações no p53 também podem alterar, em parte, a metabolização da β -Catenina, e serem coadjuvantes de algumas neoplasias, como a de cólon (MATSUZAWA; REED, 2001).

Figura 2.9 - Via de sinalização do Wnt (BIOCARTA: www.biocarta.com)

2.4.2.2 β -Catenina e EGF

Receptores C-erbB constituem a família de receptores tirsino-quinases, que é formada por quatro membros: EGFR (receptor do fator de crescimento epitelial), c-erbB-2/HER2, c-erbB-3/HER3 e c-erbB-4/HER-4. XIA e colaboradores (1999), mostraram que a co-expressão de todos estes receptores estava relacionada com o prognóstico de carcinomas de cabeça e pescoço (XIA et al., 1999).

Entretanto, existe maior evidência do envolvimento do EGFR e *c-erbB-2/HER2*, com o desenvolvimento e prognóstico dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Estão expressos predominantemente em células epiteliais, precursoras normais destas neoplasias (CARPENTER, 1987; IBRAHIM et al., 1997; WERKMEISTER; BRANDT; JOOS, 2000; WILKMAN et al., 1998).

Estudos mostraram que o EGFR pode atuar como oncogene, quando expresso em altos níveis, em fibroblastos, após expostos ao fator de crescimento transformador- α (TGF α) (DI FIORE et al. 1987; VELU et al. 1987).

A via de sinalização do EGF participa na patogênese e manutenção de uma grande quantidade carcinomas. Nestas neoplasias, comumente observam-se aumento dos ligantes para EGFR, ou mesmo, superexpressão do EGFR (MOGHAL; STERNBERG, 1999).

A expressão aumentada do EGFR já foi relacionada com papilomas laríngeos (VAMBUTAS et al., 1993), carcinomas de cabeça e pescoço (FIELD, 1992; KEARSLEY et al., 1991; IRISH; BERNSTEIN, 1993) e células derivadas de tumores malignos de cabeça e pescoço (WEICHSELBAUM et al., 1989).

Além de estimular a proliferação, o EGFR impede a posterior diferenciação da célula epitelial. GRANDIS et al.(1998) relacionaram o EGFR com o pior prognóstico das neoplasias de cabeça e pescoço.

Segundo Rogers et al. (2005), Cerb-2 e Cerb-3, são potentes ativadores da via da PI3K. Este autor afirma que Cerb-3 liga-se diretamente a subunidade p85, da PI3K, aumentando o fenótipo maligno das neoplasias de cabeça e pescoço.

Nas neoplasias malignas epiteliais, a interação do EGFR/*c-erbB2* com a β -Catenina, ocorre tanto diretamente - fosforilação, quanto indiretamente - através da ativação da proteína Akt, como visto anteriormente (LIANG; SLINGERLAND, 2003) (Figura 2.10).

A fosforilação direta da β -Catenina, pelo EGFR ativado, resulta na disfunção da adesão mediada pela Caderina E e na liberação de β -Catenina para o citoplasma, aumentando, desta forma, a proliferação e motilidade celulares, invasão e metástase (HIROHASHI, 1998; SHIOZAKI et al.,1995; BIANCO et al., 2003).

Ainda, o EGFR pode ser ativado por outros receptores de tirosino-quinases (RTKs) como, por exemplo, o receptor para proteínas-G (GPCR) que, através da sinalização sequencial de três proteínas transmembrânicas: GPCR – MMP – EGFR, ativa a via de sinalização Ras-MAP Kinase (FISCHER et al., 2003; WETZEKER; BOHMER, 2003).

Finalmente, esta via está classicamente envolvida na proliferação de inúmeras neoplasias, já que seu principal efeito *downstream* é o aumento da transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo celular, como a Ciclina D1 (ROGERS et al., 2005).

Figura 2.10 - principais vias ativadas pelos receptores *cerbBs*: Em detalhe, a Via do PI3K com ativação final da proteína AKT, proteína esta que bloqueia o GSK-3. (Adaptado: CITRI, SHARIA & YARDEN, 2003)

2.5 Ciclina D1

2.5.1 ciclinas: panorama geral

As ciclinas são proteínas de baixo peso molecular, presentes em todas as células eucarióticas. Elas desempenham um importante papel, como ativadoras, na sucessão dos

principais pontos de transição do ciclo celular. Atuam como subunidades reguladoras de quinases dependentes de ciclinas (Cdks) (MURRAY; HUNT, 1993; JACKS; WEINBERG, 1998).

As Cdks funcionam como serina-treonina quinase, se estão associadas com a proteína ciclina. São positivamente reguladas, através da CAK (cyclin activated kinase) e cdc25. A regulação negativa acontece por ação da weel-kinase e inibidores de ciclina quinase (MORGAN, 1997; JACKMAN; PINES, 1997).

As ciclinas estão presentes somente em momentos específicos do ciclo celular. Isto é resultado de indução e eliminação específicas destas proteínas durante todo o ciclo celular.

A indução destas proteínas ocorre quando as células entram no ciclo celular a partir de um estado quiescente. Para isto, requerem fatores de crescimento e aderência aos componentes da matriz extracelular, como colágeno ou fibronectina (MICHALIDES, 1999).

A ligação dos fatores de crescimento a seus respectivos receptores, tanto na superfície celular (como o EGF), como no citoplasma (no caso de esteróides), estimula uma cascata de eventos pela qual o sinal do ligante ao seu receptor é transmitido ao núcleo, resultando na ativação de fatores de transcrição (MICHALIDES, 1999).

As diferentes ciclinas estão envolvidas em diferentes fases do ciclo celular. A ciclina E-cdk2 é responsável pela progressão da célula, através da fase G1 até o ponto de restrição (ponto R), da fase G1. A ciclina D-cdk4, pela transição da fase G1, para a fase S, através do ponto R. A ciclina A-cdk2 está envolvida na progressão da fase S. Finalmente, a ciclina B-cdk1 e ciclina A-cdk1 estão envolvidas nas fases G2 e transição da fase G2 para a fase M (Figura 2.11).

A partir do ponto R, as transições do ciclo celular tornam-se automáticas. Desta forma, este é o ponto mais importante de regulação do ciclo celular. Além disto, a ativação das ciclinas da fase G1 está associada à síntese do DNA, essencial na fase S, e com a indução da ciclina B

durante a fase G2 (CONNELL-CROWLEY, ELLEDGE; HARPER, 1998; JOHNSON et al., 1993; YAN et al., 1998; KREK; XU; LIVINGSTON, 1995; GUADAGNO; NEWPORT, 1996).

Figura 2.11 - Progressão do ciclo celular. MC: check point da mitose. R: restriction point. (MICHALIDES, 1999)

2.5.2 a ciclina D1

Entre estes fatores de transcrição estão as ciclinas D. Existem três subtipos de ciclinas D (D1-3). Distribuem-se de acordo com o tipo celular. A ciclina D1 encontra-se amplamente presente em células epiteliais e fibroblastos (SHERR, 1995).

Está associada às quinases dependentes de ciclina, cdk4 e cdk6, e envolvida na transição da fase G1 para a fase S (ponto de restrição – ponto R) do ciclo celular. Este complexo é

positivamente regulado pela CAK (fosforilação), no resíduo Thr-172.P, e pela cdc25 (defosforilação), nos resíduos Thr-16.P e Tyr-17.P. A regulação negativa dá-se pela weel-mik kinase e inibidores de ciclina quinase (cki).

O alvo final deste complexo (a associação da ciclina D1 ao cdk4 ou cdk6) é a proteína do retinoblastoma (pRb). A fosforilação da proteína do retinoblastoma libera fatores de transcrição (E2F), que são requisitados para a transcrição de genes, os quais codificam as proteínas envolvidas na síntese do DNA, como a ciclina D1 e mandatórias, para a progressão da fase S. A regulação destas proteínas dá-se, então, por *feedback* positivo (MICHALIDES, 1999; WEINBERG, 1995) (Figura 2.12).

Figura 2.12 - Representação esquemática da regulação da Ciclina D1

A fosforilação das ciclinas, através dos complexos cdk, cria um alvo para a ubiquitinação dependente da degradação mediada por proteases (DIEHL; ZINDY; SHERR, 1997). Assim, a degradação da ciclina D1 resulta da ubiquitinação dependente da degradação proteossomal, após ser fosforilada pelo GSK3-beta (HUNTER; PINES, 1994; WON KA; REED, 1996).

Foi também mostrado que a ciclina D1 mutante permanece refratária à fosforilação pelo GSK-3 β , permanecendo no núcleo e, desta forma, continua atuando no ciclo celular. A ciclina D1 mutante consegue “escapar” do GSK-3 β , através da mutação que ocorre no resíduo da treonina-286, onde este resíduo é substituído por uma adenosina (DIEHL, ZINDY & SHERR, 1997).

Finalmente, segundo Solomon et al. (2003), a ciclina D1 apresenta-se em duas formas: a D1a e D1b. A D1 b não possui o sítio de fosforilação (treonina –286), que é requerido para a exportação desta proteína do núcleo para o citoplasma, onde é degradada; sendo mais estável que a ciclina D1 a. Esta, por sua vez, é transportada para o citoplasma, durante a fase S e, posteriormente, degradada.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo destina-se a avaliar:

- 1- O efeito da inibição e ativação, *in vitro*, do PI3K, nos carcinomas de cabeça e pescoço.
- 2- O *crosstalk* entre as Vias de Sinalização do PI3K e Wnt.
- 3- Possível atuação direta nuclear, exercida pela proteína PTEN, na modulação da proliferação tumoral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo Celular

Foram utilizadas três linhagens celulares (aprovação pelo Comitê de Ética – AnexoA):

- 1) Hn-6 e Hn-31: células originárias de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, doadas pelo NIH (National Institutes of Health). Origem e estágio do tumor segundo o critério TNM, podem ser visualizados na Tabela 4.1.(CARDINALI et al., 1995)
- 2) HaCat: linhagem de queratinócito imortalizado, comercialmente conhecida como HaCat.

Tabela 4.1- Origem das linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço e sua classificação, segundo o critério TNM

	<i>HN6</i>	<i>HN31</i>
ORIGEM	Base de língua	Linfonodo
ESTÁGIO CLÍNICO	T3N2bM0	T3N0M0

As células foram plaqueadas em frascos de 25cm², contendo 5 ml de DMEM (Sigma[®] Chemical Co., St. Louis, MO – USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab[®], Campinas, SP, BR) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma[®]) e mantidas em incubadora

(Precision[®] Scientific, Winchester, West Virginia, USA) à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Todos os procedimentos do cultivo se realizaram em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura a serem utilizados. O crescimento celular foi monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Zeiss[®] - Axiovert 25- Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha) e o meio de cultura trocado a cada 48 horas.

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

Para os experimentos de Imunofluorescência, as células foram plaqueadas em quatro grupos experimentais (Figura 4.1):

1. Controle I, sem aplicação de quaisquer substâncias e com a utilização de meio sem soro por 24hs (este grupo foi utilizado como controle em relação ao grupo tratado com EGF);

2. EGF: após 24 hs em meio sem soro, as células foram estimuladas à proliferação, com aplicação de EGF (epidermal growth factor) (10ng/ml) (Sigma®) (NORDBERG et al., 2005) ;

3. Controle II, tratadas com DMSO, na mesma concentração utilizada para a diluição do wortmannin (concentração final de 5ul/ml), após a permanência de 24 hs em meio sem soro. O objetivo foi analisar a possível citotoxicidade do DMSO, já que fora utilizado como controle em relação ao grupo tratado com wortmannin;

4. Wortmannin: após 24 hs em meio sem soro, as células foram estimuladas com wortmannin (50 nM)(Sigma®) (KIPPENBERGER et al., 2005). Wortmannin é um metabólico fúngico que facilmente penetra por membranas celulares e mimetiza a função do proteína supressora de tumor PTEN. Da mesma forma, o Wortmannin inibe a função da PI3K.

Figura 4.1- Esquema do plaqueamento e tratamento das células, nas reações de Imunofluorescência

Devido à ausência de efeitos tóxicos após as reações de Imunofluorescência, que poderiam ser causados pelo DMSO, realizaram-se as reações de Western-Blot com apenas três grupos. Foi

suprimido o grupo Controle II. Elaborou-se um controle para ambos os tratamentos (EGF e wortmannin) (Figura 4.2).

1. Controle: células foram mantidas em meio sem soro por 24hs.
2. Após 24 hs em meio sem soro, as células foram estimuladas à proliferação, com aplicação de EGF (10ng/ml) (Sigma®) (NORDBERG et al., 2005) ;
3. Após 24 hs em meio sem soro, as células foram estimuladas com um simulador do gene supressor de tumor PTEN - o wortmannin (50 nM)(Sigma®) (KIPPENBERGER et al., 2005).

Figura 4.2- Esquema do plaqueamento e tratamento das células, nas reações de Western Blot

4.2 Imunofluorescência

Cultivadas sobre as lamínulas de vidro, as células dos três grupos experimentais eram lavadas em solução tampão fosfato-salina livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} (PBS), pH 7,2, e fixadas em metanol por 6 min a -20°C . As amostras passavam por 4 lavagens com PBS, durante 5 minutos, e, então, incubadas, com BSA 1%, por 30 minutos. Em seguida era realizada a incubação dos anticorpos primários anti-mouse β Catenina 1:200 (BD Transduction[®]), anti-mouse Ciclina D1 1:100 (Santa Cruz[®]), anti-mouse Pten 1:50 (Santa Cruz[®]), por 1 hora. Após nova lavagem, era feita incubação com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína, à diluição de 1:50, por 45 minutos (Amersham[®] Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).

Finalmente, as lamínulas eram montadas sobre lâminas de vidro com meio de montagem Vectashild (Vector[®]).

4.3 Análise dos Resultados

As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Zeiss[®] Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

O grupo controle I, tratado apenas com meio sem soro, foi comparado ao grupo tratado com 10ng/mlEGF. Da mesma forma, o grupo controle II, tratado com 25uL/ml de DMSO, foi comparado ao grupo tratado com 50nM de Wortmannin

4.4 Western blot

Após a sub-confluência (70% da área cultivável), o meio era removido, as células lavadas 2X com PBS, a frio, e colocadas sobre o gelo (4°C). Foi adicionado, para os lisados totais, 0,5ml/placa de tampão RIPA⁺ (10 mM Tris HCl pH 7,5; 10mM desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2µg/ml aprotinina, 2µg/ml pepstatina, 1Mm PMSF) e as células foram incubadas, por 10 min, nesta temperatura, sob agitação. O lisado foi centrifugado a 15000 rpm por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante foi aliqotado e estocado a -80 °C.

Para os lisados parciais, utilizou-se o kit Ne-Per® (Pierce), no qual as proteínas nucleares foram separadas das citosólicas, conforme instruções do fabricante. As membranas plasmática e nuclear foram descartadas, em associação ao citoesqueleto, conforme as frações eram separadas. O estoque também foi feito a -80°C.

As proteínas de ambos lisados foram quantificadas com o kit BCA Protein Assay Kit (Pierce® Biotechnology, Rockford, Illinois, USA), segundo as instruções do fabricante.

As alíquotas do lisado, contendo 20µg de proteína total, eram misturadas com tampão de amostra, para concentração final de 1X. Em seguida, as amostras foram fervidas, por 5 min, e submetidas à SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada a 120V, por 150 minutos, em gel de

acrilamida com gradiente de 4-12%. O padrão de peso molecular utilizado foi o SeeBlue Pre-Stained Standard® (Invitrogen - Carlsbad, Califórnia, USA).

A transferência das proteínas para a membrana de PVDF foi feita por eletro-transferência úmida em aparelho especial (NuPage® – Invitrogen - Carlsbad, Califórnia, USA). O tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) foi utilizado como recomendado pelo fabricante. A transferência foi feita com 30mA, por 120 min. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio.

Para a imunorreação, foram feitas duas diferentes formas de bloqueio dos sítios inespecíficos, dependendo do anticorpo primário:

- 1) anticorpos fosforilados ou oriundos da empresa Sigma (indicação do fabricante): bloqueio realizado com BSA a 5% em TBST, por 2 hs, em temperatura ambiente e sob agitação (anticorpos: pAkt, Akt, PTEN e HSP90).
- 2) Demais anticorpos (ciclina D1, tata-binding e β -catenina): bloqueio realizado com 5% de leite em pó desnatado em TBST, por 2h, em temperatura ambiente, sob agitação.

Em seguida, a solução de bloqueio foi removida, lavando-se com TBST. O anticorpo de interesse (anti- β -Catenina, anti-ciclina D1, anti-PTEN, anti-Akt e anti-pAkt) foi diluído em solução de bloqueio (Tabela 4.2) e incubado *overnight*, sob agitação, em geladeira. Seguiam-se três lavagens, de 10 min, para remoção do anticorpo não-absorvido, com TBST, sob agitação e à temperatura ambiente.

Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase utilizados foram ImmunoPure® Peroxidase Conjugated Goat anti-Rabbit IgG ou ImmunoPure® Peroxidase Conjugated Goat anti-Mouse IgG (Pierce®), conforme requeria o anticorpo primário utilizado. O anticorpo

secundário foi diluído 1:1000, em solução de bloqueio, e incubado por 1 hora. Após a incubação, foi lavado em TBST, por três passagens (10 min cada lavagem).

Os anticorpos utilizados como controle de *loading* foram o HSP90 (frações total, citosólica e nuclear) e o tata-binding protein (fração nuclear).

A proteína HSP90 (*heat shock protein 90*) está presente em todos os compartimentos celulares. Esta proteína é estável (importante utilização como *housekeeping*) e abundante intracelularmente. Ainda, é considerada uma chaperone molecular que possui, entre outras funções, a estabilização da proteína Akt (TSURUO et al., 2003).

A proteína tata-binding está exclusivamente expressa no compartimento nuclear. É necessária para o início da transcrição, através de sua ligação ao TATA-BOX. A utilização deste anticorpo foi importante para checar a correta separação dos lisados parciais.

A detecção da reação foi realizada através do método quimioluminescente (ECL). Os kits de revelação SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate ou SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate, (Pierce®) foram utilizados, dependendo da sensibilidade da proteína estudada (Tabela 4.2). Os reagentes, SuperSignal® Luminol Solution e SuperSignal® Stable Peroxide Solution, foram misturados na proporção de 1:1, conforme indicação do fabricante. Após a exposição da membrana a esta solução química, por cinco minutos, a mesma era envolta em Magipack® e mantida em contato com o filme radiográfico (KODAK®), na câmara escura. O tempo de exposição variou conforme a proteína estudada, de 15 segundos a 2 minutos (Tabela 4.2). Finalmente, o filme era revelado na máquina de revelação automática KODAK®.

Os filmes, depois de revelados, foram analisados e escaneados em escaner convencional.

Tabela 4.2- Especificações técnicas dos anticorpos utilizados nas reações de western blot

Anticorpos	Anti-β-catenina	Anti-CD1	Anti-PTEN
Empresa	BD Transduction	Santa Cruz	Cell Signalling
Source	mouse	rabbit	rabbit
Concentração	1:1500	1:100	1:1000
Kit de revelação utilizado	SuperSignal® West Dura	SuperSignal® West Dura	SuperSignal® West Dura
Tempo de exposição em contato com o filme radiografico	10 segundos	2 minutos	30 segundos

Anticorpos	Anti-AkT	Anti-pAkt	Anti-HSP90	Anti-tata-binding
	Akt 1, 2 e 3	Ser-473		
		Akt 1, 2 e 3		
Empresa	Cell Signalling	Cell Signalling	Cell Signalling	abcam
Source	rabbit	rabbit	rabbit	mouse
Concentração	1:1000	1:1000	1:1000	1:1000
Kit de revelação utilizado	SuperSignal® West Dura	SuperSignal® Femto Maximum Sensitivity	SuperSignal® West Dura	SuperSignal® West Dura
Tempo de exposição em contato com o filme radiografico	1 minuto	15 segundos	30 segundos	15 segundos

5 RESULTADOS

As linhagens HaCat, HN6 e HN31 foram tratadas com wortmannin e EGF (segundo concentrações e tempos encontrados na literatura, citados em Materiais e Métodos).

Nas reações de imunofluorescência, o grupo tratado com EGF foi comparado ao grupo Controle I e, o grupo tratado com wortmannin, foi comparado ao grupo Controle II, já que o wortmannin fora diluído em DMSO (dimethyl sulfoxide). Desta forma, pudemos analisar possível efeito tóxico do DMSO sobre as linhagens estudadas.

5.1 Proliferação celular: níveis totais de Ciclina D1 e sua localização segundo a via de sinalização estimulada

5.1.1 localização da proteína Ciclina D1 após estimulação da via de sinalização do EGF (imunofluorescência)

Nas linhagens HaCat, HN6 e HN31, tanto no grupo Controle I (24hs sem soro) (Figura 5.1 A, C e E), quanto naquele tratado com EGF (Figura 5.1 B, D e F), a marcação da Ciclina D1 foi predominantemente nuclear. Não houve diferença na localização desta proteína entre os dois diferentes grupos.

Em ambos os grupos, estava presente uma tênue co-marcação citoplasmática.

5.1.2 localização da proteína Ciclina D1 após estimulação da via de sinalização do PTEN (imunofluorescência)

Todas as linhagens, que foram submetidas ao tratamento com wortmannin, mostraram intenso acúmulo da Ciclina D1 no citoplasma, claramente visível nas reações de imunofluorescência, quando comparamos os grupos tratados (Figura 5.2: B, D e F) aos grupos Controles II (24hs sem soro + DMSO) (Figura 5.2: A, C e E).

Na linhagem HN6 observaram-se poucas células positivas para Ciclina D1 nuclear, após o tratamento com wortmannin (Figura 5.2: D). As células HaCat e a HN31 foram 100% negativas para ciclina D1 no núcleo, após este mesmo tratamento (Figura 5.2: B e F).

Alteração morfológica compatível com efeito citotóxico é encontrada na linhagem HaCat, após tratamento com wortmannin (Figura 5.2 B).

5.1.3 níveis totais de Ciclina D1, após estimulação das vias de sinalização do PTEN e do EGF (western blot)

Apesar de não ter havido diferença na localização da Ciclina D1 (36kDa), após o tratamento com EGF, houve aumento nos níveis totais desta proteína em todas as linhagens estudadas, quando comparação é feita em relação aos níveis encontrados no grupo Controle (Figura 5.2 G-I).

Entretanto, não houve diferença significativa na quantificação total da proteína Ciclina D1, quando as células são tratadas com wortmannin (Figura 5.2 G-I).

5.2 Atividade antiproliferativa indireta exercida pela proteína PTEN

5.2.1 localização e quantificação da proteína β -Catenina nos diferentes compartimentos celulares: adesão ou efetiva participação na sinalização de proliferação?

5.2.1.1 *HaCat*

Ambos os controles (Controle I – 24hs sem soro, e Controle II – 24hs sem soro + DMSO) apresentaram padrões de expressão muito semelhantes para β -Catenina. Estes padrões estavam representados por moderada marcação citoplasmática acompanhada de uma expressão em membrana plasmática (Figura 5.3 A e C). Aparentemente, a marcação na membrana foi um pouco maior no grupo Controle II (24hs sem soro + DMSO) (Figura 5.3 A). Condensações citoplasmáticas, compatíveis com adesões focais, foram encontradas no citoplasma das células do grupo Controle I (Figura 5.3 C).

O grupo tratado com EGF foi marcado por uma predominante marcação em membrana plasmática (Figura 5.3D), enquanto o tratamento com wortmannin mostrou-se novamente tóxico para esta linhagem celular (Figura 5.2B). Neste último grupo, nota-se perda da individualidade celular em algumas áreas e solução de continuidade em outras regiões.

Com relação à quantificação desta proteína, nesta linhagem, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos tratados, através da reação de western blot (Figura 5.3 E e F). A fração citosólica apresentou maior quantidade de proteína, mas não houve diferença entre os

diferentes tratamentos (Figura 5.3F). A quantidade da β -Catenina total e nuclear também não mostrou diferença entre os grupos tratados (Controle, wortmannin e EGF) (Figura 5.3 E e F).

5.2.1.2 HN6

Nesta linhagem, o grupo Controle II (24hs sem soro + DMSO) apresentou uma leve marcação citoplasmática acompanhada de marcação pontual na membrana plasmática (Figura 5.3G), caracterizando as junções aderentes. Os demais grupos apresentaram marcações muito semelhantes, representadas pela expressão em membrana plasmática (Figura 5.3 H, I e J). O grupo Controle I (24hs sem soro) (Figura 5.3I) apresentou marcação aparentemente mais intensa do que os demais (EGF e wortmannin) (Figura 5.3 J e H).

Novamente, a quantificação desta proteína não mostrou diferenças significantes entre os tratamentos (Figura 5.3 K e L). Ainda, a expressão da β -Catenina apresentou-se em maior quantidade na fração citosólica, como havia acontecido na linhagem HaCat (Figura 5.3 L). A fração nuclear e a quantidade de proteína total, também não foram alteradas em função dos diferentes tratamentos (Controle, wortmannin e EGF) (Figura 5.3 K e L).

5.2.1.3 HN3I

A linhagem celular HN31 exibiu marcação, tanto qualitativa quanto quantitativa, semelhante às outras linhagens (Figura 5.4 A, B, C, D, E e F).

A imunofluorescência mostrou marcação predominante em membrana plasmática acompanhada de leve expressão citoplasmática, na totalidade dos grupos tratados e controles (Figura 5.4 A-D).

Aparentemente, houve menor expressão membrânica no grupo Controle II (24hs sem soro + DMSO) (Figura 5.4 A). Encontrou-se expressão citoplasmática aumentada e associada a uma marcação, compatível com região nuclear, quando as células foram tratadas com EGF (Figura 5.4 D).

O western blot mostrou mesma quantidade da proteína β -Catenina, após os distintos tratamentos (Figura 5.4 E e F). Novamente, o citosol apresentou maior quantidade protéica quando comparado ao núcleo (Figura 5.4 F) e à totalidade celular (Figura 5.4 E). Entretanto, dentro de cada compartimento (citosol ou nuclear), ou mesmo no lisado total celular, não houve diferença na quantidade desta proteína, entre os grupos em estudo (Controle, wortmannin e EGF).

5.2.2 AKT/mTOR: provável mecanismo envolvido na sinalização de proliferação?

5.2.2.1 quantificação celular total das proteínas Akt e pAkt nas linhagens HaCat, HN6, e HN31

Com relação à quantificação total da proteína Akt fosforilada (pAkt), houve um expressivo aumento, após o tratamento com EGF, acompanhado de intensa diminuição quando as

células foram tratadas com Wortmannin, se comparados ao grupo Controle; nas linhagens HN6 e HN31 (Figura 5.5 B e C).

A linhagem HaCat apresentou intensa diminuição, nos níveis totais da proteína pAkt, após o tratamento com wortmannin sem, no entanto, apresentar expressivo aumento desta proteína, após o tratamento celular com o fator de crescimento EGF, quando os comparamos ao Controle (Figura 5.5 A).

De outra parte, praticamente não houve alteração significativa, nos níveis totais da proteína Akt (Figura 5.5 A, B e C).

5.2.2.2 quantificação citosólica das proteínas Akt e pAkt nas linhagens HaCat, HN6 e HN31

A proteína pAKT citosólica mostrou quantidade aumentada, após o tratamento com EGF, em todas as linhagens, exceto na HN31 (Figura 5.5 D, E e F). Nesta linhagem, apesar de ter havido depleção dos seus níveis citosólicos, após o tratamento com wortmannin, as células tratadas com EGF não mostraram quantidade de pAkt (livre e citosólica) maior do que aquelas que foram mantidas apenas em meio sem soro (grupo Controle) (Figura 5.5F).

A quantidade da proteína Akt citosólica diminuiu, discretamente, após o tratamento com EGF, nas linhagens HaCat e HN31 (Figura 5.5 D e F). A linhagem HN6 não apresentou alteração nos níveis citosólicos desta proteína (Figura 5.5 E).

5.2.2.3 quantificação nuclear das proteínas Akt e pAkt nas linhagens HaCat, HN6 e HN31

A proteína Akt total foi encontrada, na fração nuclear, em todas as linhagens e tratamentos (Figura 5.5 G, H e I). Não houve alteração significativa nos níveis nucleares desta proteína, quando comparamos o grupo controle àqueles tratados. Entretanto, a fração fosforilada desta mesma proteína não foi detectada, no compartimento nuclear, em nenhuma das linhagens celulares estudadas (Figura 5.5 G, H e I).

5.3 Atividade antiproliferativa direta exercida pela proteína PTEN

5.3.1 localização da proteína PTEN após a estimulação das células com EGF

De forma geral, as linhagens apresentaram predominante expressão citoplasmática, acompanhada de alguma expressão nuclear (Figura 5.6 A-F).

A totalidade das linhagens celulares, quando mantidas em meio sem soro, por 24hs (Controle I – 24hs sem soro), apresentaram uma intensa expressão citoplasmática da proteína PTEN (Figura 5.6 A, C e E). Ademais, a linhagem HaCat, apresentou marcação em região compatível com área nuclear (Figura 5.6 A).

Após o tratamento com EGF, as células apresentaram marcação citoplasmática semelhante, porém, com aspecto vesiculado (composto por vesículas evidentes e de moderado

diâmetro). Este padrão de marcação é claramente observado nas linhagens HN6 e HN31 (Figura 5.6 D e F). Finalmente, nas linhagens Hacat e HN31 tratadas com EGF, foi encontrada marcação compatível com região nuclear (Figura 5.6 B e F).

5.3.2 localização da proteína PTEN após a estimulação das células com wortmannin

Em todas as linhagens celulares foram encontrados padrões de marcação muito semelhantes entre os grupos ControleII (24hs sem soro + DMSO) e os grupos tratados com wortmannin (Figura 5.7 A-F).

Esta expressão foi predominantemente citoplasmática, em ambos os grupos (Controle II – 24hs sem soro + DMSO e wortmannin) (Figura 5.7 A-F). Ademais, numerosas e pequeninas vesículas foram identificadas, principalmente, após o tratamento com wortmannin,

5.3.3 níveis celulares totais, da proteína PTEN, após os tratamentos com wortmannin e EGF

Os níveis celulares totais desta proteína foram aumentados, na linhagem HN31, após o tratamento com EGF (Figura 5.8 C). Nas linhagens HaCat e HN6, houve discreto aumento nos níveis de PTEN após os tratamentos com EGF e wortmannin (Figura 5.8 A e B).

5.3.4 níveis citosólicos, da proteína PTEN, após os tratamentos com wortmannin e EGF

Na linhagem HN6, os níveis citosólicos da proteína PTEN foram mantidos após os diferentes tratamentos (wortmannin e EGF), se comparados com o grupo Controle (Figura 5.8 E). As células HaCat e HN31, após o tratamento com wortmannin, apresentaram discreto aumento nos níveis desta proteína, na fração citosólica (Figura 5.8 D e F).

5.3.5 níveis nucleares, da proteína PTEN, após os tratamentos com wortmannin e EGF

Nas linhagens HaCat e HN6, a proteína PTEN foi encontrada em menor quantidade, após o tratamento com EGF (Figura 5.8 G e H). Os níveis nucleares subsequentes ao tratamento com wortmannin foram mantidos na linhagem HN6 e, discretamente diminuídos, na linhagem HaCat (Figura 5.8 G e H).

De outra parte, os níveis nucleares da proteína PTEN, na linhagem HN31, foram aumentados, principalmente, após o tratamento celular com EGF (Figura 5.8 I). Entretanto, nas células que foram submetidas ao tratamento com wortmannin, observa-se aumento um pouco mais discreto do que aquele apresentado após o tratamento com EGF (Figura 5.8 I).

Figura 5.1 - Localização da proteína ciclina D1, nas linhagens HaCat, HN6 e HN31; segundo o tratamento celular realizado. A-F, proteína ciclina D1 permanece no compartimento nuclear, após o tratamento das células com EGF (10ng/ml - 18hs)

Figura 5.2 - Níveis totais de ciclina D1 e sua localização, nas linhagens HaCat, HN6 e HN31; segundo o tratamento celular realizado. A-F, acúmulo citoplasmático da proteína ciclina D1, após o bloqueio da via de sinalização do PI3K (tratamento das células com wortmannin). G-I, níveis celulares totais da proteína ciclina D1 (36kDa), após o bloqueio (tratamento celular com wortmannin) e a ativação (tratamento celular com EGF) da via de sinalização do PI3K. A proteína HSP90 (92kDa) foi utilizada como loading control

Figura 5.4 - Localização e quantificação da proteína b-catenina, na linhagem HN31, tratada com wortmannin e EGF. Localização da proteína b-catenina em células HN31 (A-D), nas quais ativou-se as vias de sinalização do PTEN e do EGF (imunofluorescência). Quantificação da proteína b-catenina (92kDa), na linhagem HN31 (E e F), após o tratamento com wortmannin e EGF (western-blot - utilização de lisado total e frações: citosólica e nuclear). As proteínas HSP90 (92kDa - lisados total, citosólico e nuclear) e tata-binding (38kDa - lisados citosólico e nuclear) foram utilizadas como loading control

Figura 5.5 - Quantificação das proteínas Akt/pAkt nos diferentes compartimentos celulares. Quantificações celulares total (A-C: utilização de lisados totais), parcial citosólica (D-F: utilização de lisados parciais citosólicos) e parcial nuclear (G-I: utilização de lisados parciais nucleares); das proteínas pAkt (60kDa) e Akt (60kDa), nas linhagens HaCat, HN6 e HN31, tratadas com 50nM de wortmannin e 10ng/ml EGF. As proteínas HSP90 (92kDa) e tata-binding (38kDa) foram utilizadas como loading control, sendo a HSP90 utilizada para os lisados totais / parciais citosólicos e nucleares e a tata-binding, apenas para os lisados parciais citosólicos e nucleares

Figura 5.6 - Localização da proteína PTEN, nas linhagens HaCat, HN6 e HN31; segundo via de sinalização estimulada. A-F, localização predominantemente citoplasmática (vesiculada) da proteína PTEN, após o tratamento das células com EGF

Figura 5.7 - Localização da proteína PTEN, nas linhagens HaCat, HN6 e HN31, segundo via de sinalização estimulada. A-F, localização da proteína PTEN não sofreu grandes alterações, decorrente do tratamento celular com wortmannin

Figura 5.8 - Níveis totais e parciais (citossólico e nuclear) da proteína PTEN. Quantificações total (A, B e C), citossólica (D, E e F) e nuclear (G, H e I) da proteína PTEN, nas linhagens HaCat, HN6 e HN31, tratadas com 50nM Wortmannin e 10ng/ml EGF. As proteínas HSP90 (92kDa) e Tata-binding (38kDa) foram utilizadas como controle de loading, sendo a HSP90 utilizada para os lisados totais / parciais citossólicos e nucleares e a Tata-binding, apenas para os lisados parciais citossólicos e nucleares.

6 DISCUSSÃO

A cada ano, no mundo, 500.000 novos casos de carcinoma de cabeça e pescoço são diagnosticados. Ademais, 34% deles são realizados tardiamente, sem possibilidade de cura para o paciente. Pesquisas mostram que os sinais desta patologia estão presentes por, aproximadamente, três anos antes da detecção clínica (BSOUL; HUBER; TEREZHALMY, 2005; SUDBO, 2004; FRANCESCHI et al., 2000). Isto mostra um despreparo da clínica médico-odontológica, para o diagnóstico precoce destas lesões. Como consequência, gasta-se muito com o tratamento que é, muitas vezes, insuficiente.

A procura de terapias mais eficazes, que garantam maior conforto e chance de cura para o paciente, tem sido o objetivo de inúmeros Institutos de Pesquisas e Universidades. Os Estados Unidos da América, por exemplo, majorou o orçamento de US\$ 300,00, em 1887, para mais de US\$21,3 bilhões, em 2001, destinando grande parte para o NCI (National Cancer Institute) (www.nih.gov).

Não obstante, segundo VARMUS (2006), “... the age-adjusted mortality rate for cancer is about the same in the 21st century as it was 50 years ago, whereas the death rates for cardiac, cerebrovascular, and infectious diseases have declined by about two-thirds.” – “...no século XXI, a taxa de mortalidade para o câncer, proporcional à idade, é aproximadamente a mesma de 50 anos atrás, enquanto as relativas à doenças cardíacas, cérebro-vasculares e doenças infecciosas declinaram cerca de dois-terços.”

Esta realidade é consequência do desconhecimento a respeito dos mecanismos moleculares do câncer.

O texto abaixo foi transcrito do “News and Views”, da Revista Nature (Maio de 2006). Mostra, brevemente, a mais atual discussão a respeito da gênese e transformação das neoplasias malignas, no que se refere a células-tronco.

The stem cell is a bit like the griffin of mythology – half lion, half eagle; grand and powerful, but potentially monstrous in effect. These essentially unspecialized cells can renew their own population while supplying cells that mature (differentiate) into the specialized cells necessary for all tissues. Although this ability to reproduce and self-renew is sublime when functioning properly, its disorder creates masses of dysfunctional replicating cell. Indeed, stem-cell-like cells have been found in a range of human tumors” (JANZEN; SCADDEN, 2006) – “ A célula-tronco assemelha-se ao grifo da mitologia – metade leão, metade águia, grande e poderosa - mas potencialmente monstruosa em efeito. Estas células, essencialmente não-especializadas, tanto renovam suas próprias populações, quanto suprem os diferentes tecidos com células maduras e especializadas. Apesar de esta habilidade reprodutiva e de auto-renovação ser sublime, quando propriamente funcionando, sua alteração propicia a formação de massas celulares proliferativas e com perda de função. Ademais, células semelhantes a célula-tronco têm sido encontradas em uma variada quantidade de tumores humanos.”

Populações celulares, de permeio ao tumor, com características de células-tronco, foram encontradas nas linhagens HN12 e UMSCC10b (células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço), utilizando-se citometria de fluxo. Após o tratamento celular com EGF, por 24hs, houve considerável aumento no número de células destas populações (CHEN et al., 2006).

Desta forma, a procura por proteínas, com diferentes influências, nas vias de sinalização pertencentes, tanto às células-tronco (“stem cell” = células-tronco normais), quanto às células com característica semelhante às células-tronco (“stem-cell-like cells” = células malignas), parece ser o alvo terapêutico para o câncer.

Dentre os marcadores moleculares que se encaixam nesta condição, destaca-se a proteína PTEN. (YILMAZ et al., 2006) mostraram que camundongos PTEN^{-/-} progrediram para a leucemia transplantável, de 4 a 6 semanas, após a indução da deleção deste gene. Igualmente, o transplante de células-tronco hematopoiéticas normais e com depleção do gene PTEN (mas não neoplásicas), em camundongos irradiados, foi acompanhado, respectivamente, do aumento das células normais e da diminuição das células sem expressão do gene PTEN. Assim, este estudo identificou uma importante diferença entre a manutenção de células-tronco normais e células-tronco neoplásicas.

No presente trabalho, discute-se a atividade proliferativa das células neoplásicas, advindas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. É estudado o bloqueio da via do PI3K, por atividade do wortmannin e sua ativação, pelo EGF (Figura 6.1).

Figura 6.1- Esquema final, que sintetiza as questões propostas por este estudo

6.1 Os tratamentos com EGF e Wortmannin promoveram, respectivamente, o aumento da transcrição e o acúmulo citoplasmático da proteína ciclina D1.

Sinais mitogênicos induzem o aumento na expressão do RNAm e transcrição da proteína ciclina D1. A atividade pró-proliferativa desta proteína, classicamente, é mediada através de sua habilidade de regular o ciclo celular, no ponto R, importante *checkpoint* localizado na transição da fase G1 para a fase S (KNUDSEN, 2006). Sua superexpressão é comumente encontrada na

maioria das neoplasias malignas. Ainda, esta proteína possui uma atividade independente do ciclo celular, na modulação de fatores de transcrição (COQUERET, 2002).

Neste trabalho, após o tratamento celular com Wortmannin, houve um acúmulo da ciclina D1 no citoplasma (imunofluorescência) (Figura 5.2 A-F). Entretanto, os níveis totais desta proteína, de forma geral, não foram alterados, quando comparados ao grupo controle (western blot) (Figura 5.2 G-I). A exceção foi a HN31, que mostrou uma discreta diminuição da quantidade de ciclina D1, após o tratamento com Wortmannin (Figura 5.2 I).

Segundo Alt et al. (2000), a ciclina D1 é translocada para o citoplasma, após ser fosforilada pelo GSK3- β , para sua posterior degradação. Em células de neuroblastoma, a localização citoplasmática da ciclina D1 foi relacionada com indução da diferenciação destas células (SUMREJKANACHAKI; ETO; IKEDA, 2006).

Desta forma, o acúmulo citoplasmático da ciclina D1, pode representar o início ou a “movimentação” para degradação protéica, no citoplasma (Figura 5.2 B, D e F). De outro lado, os níveis totais da ciclina D1 não foram alterados, entre os grupos wortmannin e controle (Figura 5.2 G-I). Neste sentido, o tempo de tratamento celular com wortmannin (10 min), deve ter sido insuficiente para a completa degradação desta proteína. Não obstante, a discreta diminuição ocorrida na quantificação da linhagem HN31, após o tratamento com wortmannin, nos fornece indícios de que, realmente, este acúmulo citoplasmático é o passo inicial necessário para posterior degradação protéica.

Entretanto, Alao et al. (2006) concluíram em estudo, utilizando microscopia confocal que, nas células neoplásicas humanas, o seqüestro da ciclina D1 para o citoplasma deve ser resultado da inibição de sua importação para o núcleo. Afirmam ainda, que a ciclina D1 é, de fato, uma proteína citoplasmática, sendo importada para o núcleo somente quando ativada a proliferação celular.

O tratamento celular com EGF, por 18hs, promoveu a transcrição da ciclina D1, dimensionada através do aumento dos seus níveis totais (western blot) (Figura 5.2 G-I). De outro modo, aparentemente, não foram encontradas diferenças com relação à localização desta proteína, entre os grupos controle I (24hs sem soro) e aquele tratado com EGF (Figura 5.1 A-F). Esta localização foi predominantemente nuclear, com alguma coexpressão citoplasmática.

Estudo mostra que a indução da superexpressão de ciclina D1, em células HaCat, foi acompanhada de um pequeno aumento da proliferação. Por outro lado, a atividade proliferativa ocorreu em uma escala muito maior no clone de células, nas quais se induziu, também, a superexpressão do Cdk4 (BURNWORTH et al. 2006). Igualmente, em câncer de pele, além da amplificação da ciclina D1, foram encontradas mutações no gene Cdk4 (UTIKAL et al., 2005). Landis et al. (2006) mostraram que camundongos com deficiência na ativação do Cdk4, possuem desenvolvimento normal das glândulas mamárias, enquanto que os mesmos foram incapazes de responder à estimulação tumoral via Her2/Neo. Este resultado mostra que, aparentemente, a atividade do Cdk4 dependente da Ciclina D1, não é necessária para o normal desenvolvimento, mas indispensável para a progressão neoplásica (LANDIS et al., 2006).

Ademais, a variante ciclina D1b, constitutivamente estável no compartimento nuclear, está relacionada com o aumento da susceptibilidade à progressão neoplásica, e sua atuação parece ser independente das Cdks (KNUDSEN, 2006).

BILL e colaboradores (2004) corroboram com nosso estudo, já que encontraram a ativação da ciclina D1 associada à Cdk4, após a estimulação do EGFR por integrinas, em células epiteliais.

6.2 Atividade indireta do PTEN

6.2.1 β -catenina: efetiva participação na via de proliferação neoplásica?

A dinâmica celular e as mudanças morfológicas que ocorrem durante o desenvolvimento de diferentes organismos dependem, precisamente, do controle dos mecanismos de adesão celular. Um dos mais importantes tipos de adesão celular, tanto em organismos vertebrados, quanto em invertebrados, são os mediados pela família das proteínas transmembrânicas cálcio-dependentes, as caderinas. A caderina-E liga-se ao citoesqueleto (α -catenina), através da interação de seu domínio citoplasmático, com a proteína β -catenina (GOODING, YAP & IKURA, 2004). Além desta função, e de maior relevância para este estudo, é o envolvimento da β -catenina livre citoplasmática (via do Wnt) na progressão e proliferação neoplásicas, afora a transformação metastática, em diversos tipos de cânceres como, por exemplo, os cânceres de cólon e mama (DENG et al., 2002).

No presente estudo foi avaliada a expressão desta proteína, com relação à sua localização e quantificação, nos distintos compartimentos celulares.

Através da imunofluorescência, encontrou-se marcação com predominância na membrana plasmática, independentemente do tratamento celular aplicado (Figura 5.3 A-D e G-J, Figura 5.4 A-D). Esta expressão ocorreu em todas as linhagens celulares, principalmente nas regiões de contato intercelular.

Aparente co-marcação citoplasmática, de leve a moderada, foi encontrada nas células: HaCat (grupos controles I e II), HN6 (grupo controle II) e HN31 (grupos tratados com EGF e

wortmannin). Entretanto, não houve correlação alguma entre estas expressões e os diferentes tratamentos (Figuras 5.3 A-D e G-J; Figura 5.4 A-D).

A linhagem HaCat apresentou alterações morfológicas (solução de continuidade da monocamada associada à perda da individualidade celular), compatíveis com efeito citotóxico, após o tratamento com wortmannin (Figura 5.3 B). Isto se deve à natureza desta linhagem ser constituída por queratinócitos imortalizados e não células oriundas de neoplasias malignas propriamente ditas.

Assim como mostram nossos resultados, Jones e Veale (2003), encontraram intensa marcação da β -catenina na membrana plasmática, em células de carcinoma epidermóide de esôfago, mesmo após o tratamento celular com EGF.

A linhagem HN31, após o tratamento com EGF, apresentou uma única marcação compatível com expressão nuclear (Figura 5.4D). Apesar disto, após este mesmo tratamento, não houve aumento algum dos níveis nucleares da β -catenina, detectável pela técnica de western blot (Figura 5.4 F). Conclui-se, então, que este fato (Figura 5.4D) ocorreu por coincidência.

Segundo Gasparoni et al. (2002), após análise de queratinócitos bucais normais, células neoplásicas e tecido de biópsias extraídas de carcinoma epidermóide bucal, a presença de β -catenina nuclear parece ser um evento raro nestas neoplasias.

Ademais, a totalidade das linhagens celulares não apresentou diferença na quantificação desta proteína, no interior dos distintos compartimentos celulares (citossol e núcleo), decorrente dos diferentes tratamentos (5.3 E-F e K-L; 5.4 E-F). Os seus níveis totais também não foram alterados.

A quantidade de β -catenina, presente na fração citosólica, em todas as linhagens, foi maior do que aquela presente na fração total (Figuras 5.3 E-F e K-L; 5.4 E-F). Este fato deve ser consequência da presença de maior concentração da proteína β -catenina, no lisado citosólico.

Em concordância com nossos resultados, Yu e colaboradores, através de imunofluorescência confocal em tecido de biópsias de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, não encontraram relação entre β -catenina e ciclina D1. Também, não foram encontradas mutações no gene desta proteína.

Ausência de mutações no gene da β -catenina ou APC é um dado comumente encontrado nos carcinomas de cabeça e pescoço, de acordo com Takei et al.¹ (2003 apud YU et al., 2005).

Entretanto, em inúmeros outros tumores, como cólon e reto, hepatocelular, mama e tireóide, o acúmulo nuclear da β -catenina foi associado a um pobre prognóstico (PARK et al., 2001; GARCIA-ROSTAN et al., 2001; BRENNAN; BROWN, 2004).

Conclui-se, então, que o aumento da proteína ciclina D1, decorrente do tratamento celular com EGF, não é consequência da translocação nuclear da β -catenina, já que seus níveis nucleares não se alteram após este mesmo tratamento. Ainda, a β -catenina nuclear e/ou citosólica, não é inibida em decorrência do tratamento com wortmannin, que possui, como alvo, o bloqueio da proteína AKT. Esta proteína está relacionada à inibição do GSK3 que, por sua vez, promove o início da degradação da β -catenina. Assim, se esta via estivesse funcionando, ocorreria, também, a diminuição dos níveis citoplasmáticos e/ou nucleares da β -catenina, após o tratamento com wortmannin. Desta forma, nos carcinomas de cabeça e pescoço, a expressão membrânica da β -catenina parece estar mais associada à perda de adesão celular e conseqüente desenvolvimento de metástases, contribuindo para a agressividade desta neoplasia.

¹Takei S, Ueno Y, Yoda J, Tamura S, Hotomi M, Fujihara K, et al. Roles of beta-catenin overexpression and adenomatous polyposis coli mutation in head and neck cancer. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 2003;106(6):692-9.

6.2.2 correlação entre a expressão das proteínas Akt e pAkt

A quinase PI3K é positivamente regulada em consequência da ativação de receptores tirosino-quinases (quando ligados a fatores de crescimento), de receptores de proteína G ou integrinas (NICHOLSON & ANDERSON, 2002).

O efeito *downstream* desta via, é a fosforilação da proteína Akt (em dois diferentes resíduos - Thr308 e Sr473), que é responsável por inúmeros processos como, por exemplo, evasão à apoptose e proliferação. No presente estudo será discutido seu papel no aumento da proliferação celular, através da correlação entre sua fosforilação (ativação) e a expressão de ciclina D1, quantificada através das técnicas de western blot (pAkt e Ciclina D1) e imunofluorescência (Ciclina D1).

Após o tratamento das células com EGF, houve um sensível aumento na fosforilação da proteína Akt, em todas as linhagens celulares (Figura 5.5 A-F). As figuras 5.5A-C mostram os níveis totais desta proteína fosforilada (porção livre e citosólica + porção ligada à membrana plasmática, onde normalmente acontece a fosforilação da proteína Akt) (FILIPPA et al., 2000). Nas figuras 5.5 D-F, observa-se apenas a porção livre e citosólica da pAkt.

A linhagem HaCat não apresentou níveis totais de pAkt aumentados, após o tratamento com EGF (Figura 5.5A). Não obstante, na fração livre citosólica, ocorreu aumento significativo desta porção fosforilada, após o mesmo tratamento (Figura 5.5D). Por outro lado, as células HN31, tratadas com EGF, não apresentaram aumento, da pAkt, na fração citosólica (Figura 5.5F), porém, o inverso ocorreu, na fração total celular (Figura 5.5C). Esta diferença parece ser resultado da ativação da proteína Akt (através da fosforilação), em diferentes momentos

celulares, já que depois de fosforilada, na membrana plasmática, atua citosolicamente (FILIPPA et al., 2000).

Assim, nas linhagens estudadas, após o estímulo celular com EGF, houve aumento da fração fosforilada da proteína Akt (lisados totais e citosólicos), associado à maior taxa de transcrição da ciclina D1 (lisados totais) (Figura 5.2 G-I e Figura 5.5 A-F).

Da mesma forma, células tratadas com wortmannin apresentaram uma grande diminuição da fosforilação da proteína Akt, como mostram as Figuras 5.5 A-F. Esta alteração mostra a efetividade do tratamento com wortmannin e, principalmente, aponta-o como causa do acúmulo citoplasmático da proteína ciclina D1 (Figura 5.2 A-F).

Entretanto, após ser ativada, a proteína Akt fosforilada não foi translocada para o compartimento nuclear (Figura 5.5 G-I). Embora a presença nuclear da proteína pAkt tenha sido reportada em estudo com osteoblastos (BORGATTI et al., 2000), Lee et al. (2005), em carcinoma de estômago, mostraram que houve ativação da proliferação, associada apenas ao aumento dos níveis citosólicos da pAkt.

Figura 6.2 – Esquema da correlação tratamentos / ciclina D1 / pAkt

6.3 Atividade antiproliferativa por ação direta da proteína PTEN

A proteína PTEN está classicamente envolvida no bloqueio da via do PI3K, como mostrado nos resultados acima, entre outras funções. Durante muitos anos, pensava-se que as funções da proteína PTEN eram devidas, somente, à sua localização citoplasmática. Entretanto, recentemente, foi demonstrado que a PTEN é capaz de exercer supressão tumoral, independentemente da proteína AKT, através de sua translocação nuclear (LIU et al., 2005).

Em nossos resultados, existe a presença de PTEN nuclear, em todas as linhagens e tratamentos, visualizada através da técnica de western blot (Figura 5.8 A-I). Além do que, principalmente após o tratamento com EGF, o seu nível nuclear aumentou na linhagem mais agressiva, a HN31 (metástase regional). Por outro lado, nas linhagens menos agressivas e tratadas com EGF, houve uma diminuição dos seus níveis nucleares. Estes resultados sugerem que a atividade nuclear da proteína PTEN está, possivelmente, relacionada com a agressividade da neoplasia.

Chung, Ginn-Pease e Eng (2005) mostraram que a estrutura da proteína PTEN possui uma sequência (semelhante à NLS), que permite sua importação para o núcleo. Ademais, a sua localização nuclear foi associada à diminuição dos níveis de Ciclina D1 (CHUNG; ENG, 2005).

No presente estudo, os níveis totais e citosólicos da PTEN, de forma geral, não foram alterados. Os níveis totais apresentaram ligeiro aumento por todas as linhagens celulares, após o tratamento com EGF. Ademais, discreta quantidade aumentada da PTEN foi encontrada nas células HaCat e HN6, tratadas com wortmannin. Nos lisados parciais citosólicos, novamente, parece ter acontecido uma pequena regulação positiva, após o tratamento com wortmannin, nas

linhagens HaCat e HN31. Entretanto, correlação alguma foi encontrada nos maiores níveis de PTEN, presentes após os tratamentos com wortmannin.

As imagens de imunofluorescência, nas células tratadas com wortmannin, não mostraram diferenças dignas de nota, se as compararmos com as imagens do grupo controle II. Isto se deve ao fato de a regulação da proteína PTEN estar *upstream* ao ponto regulado pelo wortmannin. A marcação foi, predominantemente, citoplasmática e vesiculada (pequenas vesículas), com alguma expressão nuclear (Figura 5.7 A-F).

Após o tratamento com EGF, todas as linhagens celulares, foram marcadas por um padrão de expressão vesiculado, composto por moderada quantidade de vesículas, porém, muito bem definidas (Figura 5.6 B, D, F). Mostrando, desta forma, uma possível reação celular ao tratamento imposto, representado pelo transporte da PTEN para a membrana plasmática, onde é ativada (WALKER et al., 2004).

Figura 6.3- Esquema final da discussão

..... : PTEN possui atividade nuclear, já que é encontrado neste compartimento. Entretanto, mais estudos são necessários para correlacioná-lo diretamente com a Ciclina D1, no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

———— : Atividade certa e direta, exercida pela proteína (PTEN).

■ ■ ■ ■ ■ : Atividade certa e indireta, exercida pela proteína (Akt) ou PIP3.

7 CONCLUSÕES

- 1- O wortmannin foi capaz de inibir a via de sinalização do PI3K, através da diminuição dos níveis de fosforilação da proteína Akt e promoção do acúmulo citoplasmático da ciclina D1. Entretanto, não houve alteração na quantificação da β -catenina, nos diferentes compartimentos celulares.
- 2- O EGF ativou proliferação (aumento da quantidade de ciclina D1), através da ativação da via de sinalização do PI3K, independentemente da via de sinalização do Wnt (não houve alteração nos níveis celulares de β -catenina).
- 3- A proteína PTEN é translocada para o núcleo, em carcinomas de cabeça e pescoço. Ainda, na linhagem mais agressiva (HN31), principalmente após a ativação da proliferação (tratamento com EGF), houve aumento da quantidade nuclear desta proteína.

REFERÊNCIAS¹

- Adey NB, Huang L, Ormonde PA, Baumgard ML, Pero R, Byreddy DV et al. Threonine phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding. *Cancer Res* 2000;60(1):35-7.
- Alao JP, Gamble SC, Stavropoulou AV, Pomeranz KM, Lam EW, Coombes RC, et al. The cyclin D1 proto-oncogene is sequestered in the cytoplasm of mammalian cancer cell lines. *Mol Cancer* 2006;5:7.
- Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(22):1922-32.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(7):3983-8.
- Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* 2000;14(24):3102-14.
- Aman MJ, Lamkin TD, Okada H, Kurosaki T, Ravichandran KS. The inositol phosphatase SHIP inhibits Akt/PKB activation in B cells. *J Biol Chem* 1998; 273(51):33922-8.
- Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, et al. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 2002;16(9):1066-76.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996;382(6592):638-42.

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

Bianco R, Shin I, Ritter CA, Yakes FM, Basso A, Rosen N, et al. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2003; 22: 2812–2822.

Bienz M. The subcellular destinations of APC proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(5):328-38.

Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000;103(2):311-20.

Bill HM, Knudsen B, Moores SL, Muthuswamy SK, Rao VR, Brugge JS et al. Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2004;24(19):8586-99.

Birle D, Bottini N, Williams S, Huynh H, deBelle I, Adamson E et al. Negative feedback regulation of the tumor suppressor PTEN by phosphoinositide-induced serine phosphorylation. *J Immunol* 2002;169(1):286-91.

Bonneau D, Longy M. Mutations of the human PTEN gene. *Hum Mutat* 2000;16(2):109-22.

Borgatti P, Martelli AM, Bellacosa A, Casto R, Massari L, Capitani S, et al. Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. *FEBS Lett* 2000;477(1-2):27-32.

Boutros M, Mihaly J, Bouwmeester T, Mlodzik M. Signaling specificity by Frizzled receptors in *Drosophila*. *Science* 2000;288(5472):1825-8.

Brannon M, Brown JD, Bates R, Kimelman D, Moon RT. XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* 1999;126(14):3159-70.

Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002; 38: 99–166.

Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 2004;18(18):2225-30.

Brennan KR, Brown AM. Wnt proteins in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004;9(2):119-31.

Bsoul SA, Huber MA, Terezhalmay GT. Squamous cell carcinoma of the oral tissues: a comprehensive review for oral healthcare providers. *J Contemp Dent Pract* 2005;6(4):1-16.

Burnworth B, Popp S, Stark HJ, Steinkraus V, Brocker EB, Hartschuh W, et al. Gain of 11q/cyclin D1 overexpression is an essential early step in skin cancer development and causes abnormal tissue organization and differentiation. *Oncogene* 2006;25(32):4399-412.

Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature* 1975;255(5505):197-200.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296(5573):1655-7

Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(8):4240-5.

Cardinali M, Pietraszkiewicz H, Ensley JF, Robbins KC. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. *Int J Cancer* 1995;61(1):98-103.

Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* 1987;56:881-914.

Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and developed nation. *Neck* 2004;26(1):31-8.

Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003;17(3):590-603.

Chen JS, Pardo FS, Wang-Rodriguez J, Chu TS, Lopez JP, Aguilera J, et al. EGFR regulates the side population in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2006;116(3):401-6.

Chen Q, Samaranayake LP, Zhou H, Xiao L. Homozygous deletion of the PTEN tumor-suppressor gene is not a feature in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2000;36(1):95-9.

Chung JH, Eng C. Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Res* 2005;65(18):8096-100.

Chung JH, Ginn-Pease ME, Eng C. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein. *Cancer Res* 2005;65(10):4108-16.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;65(23):10946-51.

Connell-Crowley L, Elledge SJ, Harper JW. G1 cyclin-dependent kinases are sufficient to initiate DNA synthesis in quiescent human fibroblasts. *Curr Biol* 1998;8(1):65-8.

Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 2002;299(1-2):35-55

Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18(3):280-7.

Cotran RS, Robbins SL, Kumar V. *Pathologic Basis of Disease*, 5th Edition. W B Saunders Co, 1984.

Damen JE, Liu L, Rosten P, Humphries RK, Jefferson AB, Majerus PW, et al. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(4):1689-93.

Das S, Dixon JE, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(13):7491-6.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999;13(22):2905-27.

Deng J, Miller SA, Wang HY, Xia W, Wen Y, Zhou BP, et al. beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell* 2002;2(4):323-34.

Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1997;11(8):957-72.

Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987;237(4811):178-82.

Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(1):9-17.

Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 2005;65(20):9328-37

Field JK. Oncogenes and tumour-suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992;28B(1):67-76.

Filippa N, Sable CL, Hemmings BA, Van Obberghen E. Effect of phosphoinositide-dependent kinase 1 on protein kinase B translocation and its subsequent activation. *Mol Cell Biol* 2000;20(15):5712-21.

Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. EGFR signal transactivation in cancer cells *Biochem Soc Trans* 2003; 31:1203–8.

Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Munoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: Etiological clues. *Oral Oncol* 2000; 36: 106–15.

Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004;30(2):193-204.

Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK. The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res* 1998;58(22):5002-8.

Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol* 2001;158(3):987-96.

Gasparoni A, Chaves A, Fonzi L, Johnson GK, Schneider GB, Squier CA. Subcellular localization of beta-catenin in malignant cell lines and squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 2002;31(7):385-94.

Georgescu MM, Kirsch KH, Kaloudis P, Yang H, Pavletich NP, Hanafusa H. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res* 2000;60(24):7033-8.

Gooding JM, Yap KL, Ikura M. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays* 2004;26(5):497-511.

Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM et al. Levels of TGF- α and EGFR Protein in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Patient Survival. *Journal of the National Cancer Institute* 1998;90(11):824-32.

Gu J, Tamura M, Pankov R, Danen EH, Takino T, Matsumoto K et al. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol* 1999;146(2):389-403.

Guadagno TM, Newport JW. Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity. *Cell* 1996;84(1):73-82.

Guldberg P, Straten P, Birck A, Ahrenkiel V, Kirkin AF, Zeuthen J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 1997;57(17):3660-3.

Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, Mills G, Yount G, Stokoe D. Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol* 1998;8(21):1195-8.

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

Harding MW. Immunophilins, mTOR, and pharmacodynamic strategies for a targeted cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2003;9(8):2882-6.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004;18(16):1926-45.

Hecht A, Litterst CM, Huber O, Kemler R. Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro. *J Biol Chem* 1999;274(25):18017-25.

Helgason CD, Kalberer CP, Damen JE, Chappel SM, Pineault N, Krystal G et al. A dual role for Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase (SHIP) in immunity: aberrant development and enhanced function of b lymphocytes in ship ^{-/-} mice. *J Exp Med* 2000;191(5):781-94.

Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998;153(2):333-9.

Houghton J, Morozov A, Smirnova I, Wang TC. Stem cells and cancer. *Semin Cancer Biol* 2006 [Epub ahead of print]

Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 1994;127(6 Pt 2):2061-9.

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994;79(4):573-82.

Huntly BJ, Gilliland DG. Cancer biology: summing up cancer stem cells. *Nature* 2005;435(7046):1169-70.

Ibrahim SO, Vasstrand EN, Liavaag PG, Johannessen AC, Lillehaug JR. Expression of c-erbB protooncogene family members in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 1997;17: 4539-46.

Ilan N, Tucker A, Madri JA. Vascular endothelial growth factor expression, beta-catenin tyrosine phosphorylation, and endothelial proliferative behavior: a pathway for transformation? *Lab Invest* 2003;83(8):1105-15.

INCA (Instituto Nacional do Cancer). www.inca.gov.br.

Irish JC, Bernstein A. Oncogenes in head and neck cancer. *Laryngoscope* 1993;103(1 Pt 1):42-52.

Jackman MR, Pines JN. Cyclins and the G2/M transition. *Cancer Surv* 1997;29:47-73.

Jacks T, Weinberg RA. The expanding role of cell cycle regulators. *Science* 1998;280(5366):1035-36.

Janzen V, Scadden DT. Stem cells: good, bad and reformable. *Nature* 2006;441(7092):418-9

Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 1993;365(6444):349-52.

Jones LJ, Veale RB. Redistribution of beta-catenin in response to EGF and lithium signalling in human oesophageal squamous carcinoma cell lines. *Cancer Cell Int* 2003;3(1):13.

Kearsley JH, Leonard JH, Walsh MD, Wright GR. A comparison of epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB-2 oncogene expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathology* 1991;23(3):189-94.

Kippenberger S, Loitsch S, Guschel M, Muller J, Knies Y, Kaufmann R, et al. Mechanical stretch stimulates protein kinase B/Akt phosphorylation in epidermal cells via angiotensin II type 1 receptor and epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2005;280(4):3060-7

Knudsen KE. The cyclin D1b splice variant: An old oncogene learns new tricks. *Cell Div* 2006;1(1):15 [Epub ahead of print]

Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997;275(5307):1784-7.

Kramps T, Peter O, Brunner E, Nellen D, Froesch B, Chatterjee S, et al. Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 2002;109(1):47-60.

Krek W, Xu G, Livingston DM. Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell* 1995;83(7):1149-58.

Landis MW, Pawlyk BS, Li T, Sicinski P, Hinds PW. Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006;9(1):13-22.

Lee BL, Lee HS, Jung J, Cho SJ, Chung HY, Kim WH, et al. Nuclear factor-kappaB activation correlates with better prognosis and Akt activation in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2518-25.

Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee SG. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem* 2002;277(23):20336-42.

Lee JI, Soria JC, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, et al. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127(12):1441-5.

Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 1999;99(3):323-34.

Leis H, Segrelles C, Ruiz S, Santos M, Paramio JM. Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3 β during mouse skin tumorigenesis. *Mol Carcinog* 2002;35(4):180-5.

Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, van Rees B, Kurman RJ, Ellenson LH. PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 1998;58(15):3254-8.

Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor β . *Cancer Res* 1997;57(11):2124-9.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997;275(5308):1943-7.

- Li L, Yuan H, Weaver CD, Mao J, Farr GH 3rd, Sussman DJ, et al. Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J* 1999;18(15):4233-40.
- Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:605-31
- Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2003;2(4):339-45.
- Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 1997; 16(1):64-7.
- Liu C, Kato Y, Zhang Z, Do VM, Yankner BA, He X. beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(11):6273-8.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002;108(6):837-47.
- Liu JL, Sheng X, Hortobagyi ZK, Mao Z, Gallick GE, Yung WK. Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation. *Mol Cell Biol* 2005;25(14):6211-24.
- Liu Q, Sasaki T, Kozieradzki I, Wakeham A, Itie A, Dumont DJ et al. SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev* 1999;13(7):786-91.
- Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, et al. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 2000;26(2):146-7.
- Maehama T, Taylor GS, Dixon JE. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem* 2001;70:247-79.
- Malbec O, Schmitt C, Bruhns P, Krystal G, Fridman WH, Daeron M. Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 mediates cell cycle arrest by FcgammaRIIB. *J Biol Chem* 2001;276(32):30381-91.

Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 2001;7(5):915-26.

Maxwell GL, Risinger JI, Tong B, Shaw H, Barrett JC, Berchuck A, et al. Mutation of the PTEN tumor suppressor gene is not a feature of ovarian cancers. *Gynecol Oncol* 1998;70(1):13-6.

McConnachie G, Pass I, Walker SM, Downes CP. Interfacial kinetic analysis of the tumour suppressor phosphatase, PTEN: evidence for activation by anionic phospholipids. *Biochem J* 2003;371(Pt 3):947-55.

McCrea PD, Briehner WM, Gumbiner BM. Induction of a secondary body axis in *Xenopus* by antibodies to beta-catenin. *J Cell Biol* 1993;123(2):477-84.

McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999; 59(17):4291-6.

Michalides RJ. Cell cycle regulators: mechanisms and their role in aetiology, prognosis, and treatment of cancer. *J Clin Pathol* 1999;52(8):555-68.

Moghal N; Sternberg PW. Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:190-196.

Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, et al. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 1996;86(3):391-9.

Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999;21(12):1021-30. Review.

Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:261-91.

Morgensztern D, McLeod HL. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2005;16(8):797-803

Murray AW, Hunt T. The cell cycle: an introduction. NY: Oxf Uni Press 1993:251.

Myers MP, Tonks NK. PTEN: sometimes taking it off can be better than putting it on. *Am J Hum Genet* 1997;61(6):1234-8.

Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(23):13513-8.

Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, Gorlin RJ, Hamm H, et al. Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet* 1997; 6(8):1383-7.

Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002;14(5):381-95.

Nordberg E, Steffen AC, Persson M, Sundberg AL, Carlsson J, Glimelius B. Cellular uptake of radioiodine delivered by trastuzumab can be modified by the addition of epidermal growth factor. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32(7):771-7.

Obata K, Morland SJ, Watson RH, Hitchcock A, Chenevix-Trench G, Thomas EJ, et al. Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res* 1998; 58(10):2095-7.

Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J* 1989;8:1711-17.

Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4246-50.

Park WS, Oh RR, Park JY, Kim PJ, Shin MS, Lee JH, et al. Nuclear localization of beta-catenin is an important prognostic factor in hepatoblastoma. *J Pathol* 2001;193(4):483-90.

Pokutta S, Weis WI. Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol cell* 2000:533-43

Polakis P. The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9(1):15-21.

Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S, Hall A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science* 2004;303(5661):1179-81.

Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM et al. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(5):2110-5.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414(6859):105-11

Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, O-Charoenrat P, Eccles SA. Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(1):47-69.

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem* 1995;270(10):5549-55.

Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000;24(3):245-50.

Seminario MC, Wange RL. Lipid phosphatases in the regulation of T cell activation: living up to their PTEN-tial. *Immunol Rev* 2003;192:80-97.

Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* 1995;20(5):187-90.

Shiozaki H, Kadowaki T, Doki Y, Inoue M, Tamura S, Oka H, et al. Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human oesophageal cancer cell line. *Br J Cancer* 1995;71(2):250-8.

Smalley MJ, Dale TC. Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18(2):215-30.

Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambleck TC, Gresting S, Senderowicz AM, et al. Cyclin D1 splice variants: differential affects on localization, RB phosphorylation and cellular transformation. *J Biol Chem* 2003;278(32):30339-47.

Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58(6):1130-4.

Squarize CH, Castilho RM, Santos Pinto Jr D. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. *J Oral Pathol Med* 2002;31(7):379-84.

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998;95(1):29-39.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997;15(4):356-62.

Sudbo J. Novel management of oral cancer: a paradigm of predictive oncology. *Clin Med Res*. 2004;2(4):233-42.

Sumrejkanchanakij P, Eto K, Ikeda MA. Cytoplasmic sequestration of cyclin D1 associated with cell cycle withdrawal of neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(1):302-8

Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(11):6199-204.

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998;280(5369):1614-7.

Tamura M, Gu J, Takino T, Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130Cas. *Cancer Res* 1999;59(2):442-9.

Tolkacheva T, Boddapati M, Sanfiz A, Tsuchida K, Kimmelman AC, Chan AM. Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383. *Cancer Res* 2001;61(13):4985-9.

Tsao H, Zhang X, Benoit E, Haluska FG. Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. *Oncogene* 1998;16(26):3397-402.

Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, et al. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci* 2003;94(1):15-21.

Utikal J, Udart M, Leiter U, Kaskel P, Peter RU, Krahn G. Numerical abnormalities of the Cyclin D1 gene locus on chromosome 11q13 in non-melanoma skin cancer. *Cancer Lett*. 2005;219(2):197-204.

Varmus H. The new era in cancer research. *Science* 2006;312(5777):1162-5.

Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 2000;20(14):5010-8.

Vazquez F, Sellers WR. The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470(1):M21-35.

Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem* 2001;276(52):48627-30.

Velu TJ, Beguinot L, Vass WC, Willingham MC, Merlino GT, Pastan I, et al. Epidermal-growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene. *Science* 1987;238(4832):1408-10.

Walker SM, Leslie NR, Perera NM, Batty IH, Downes CP. The tumour-suppressor function of PTEN requires an N-terminal lipid-binding motif. *Biochem J* 2004;379(Pt2):301-7.

Webster MT, Rozycka M, Sara E, Davis E, Smalley M, Young N, et al. Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28(4):443-53.

Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, et al. *row* encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 2000;407(6803):527-30.

Weichselbaum RR, Dunphy EJ, Beckett MA, Tybor AG, Moran WJ, Goldman ME, et al. Epidermal growth factor receptor gene amplification and expression in head and neck cancer cell lines. *Head Neck* 1989;11(5):437-42.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81(3):323-30.

Werkmeister R, Brandt B, Joos U. Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol* 2000;36:100-5.

Wetzker R, Bohmer FD: Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Molec Cell Biol* 2003; 4: 651-7.

Wilkman TS, Heitanen JH, Malstrom MJ, Kontinen YT. Immunohistochemical analysis of the oncoprotein c-erbB-2 expression in oral benign and malignant lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27:209-12.

Won KA, Reed SI. Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J* 1996;15(16):4182-93.

Xia W, Lau Y-K, Zhang H-Z, Xiao FY, Johnston DA, Liu AR, et al. Combination of EGFR, HER-2/neu and -3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res*, 1999; 5: 4164-4174.

Yan Z, DeGregori J, Shohet R, Leone G, Stillman B, Nevins JR, et al. Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3603-8.

Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 2006;441(7092):418-9.

Yokomizo A, Tindall DJ, Hartmann L, Jenkins RB, Smith DI, Liu W. Mutation analysis of the putative tumor suppressor PTEN/MMAC1 in human ovarian cancer. *Int J Oncol* 1998;13(1):101-5.

Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev* 1996;10(12):1443-54.

Yu Z, Weinberger PM, Provost E, Haffty BG, Sasaki C, Joe J, et al. Beta-Catenin functions mainly as an adhesion molecule in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2471-7.

Zhang J, Grindley JC, Yin T, Jayasinghe S, He XC, Ross JT, et al. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* 2006;441(7092):518-22.

Zhang M, Rosen JM. Stem cells in the etiology and treatment of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16(1):60-4.

ANEXO A - Parecer de aprovação do comitê de ética em pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 123/04

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa ***"A ativação e o bloqueio da via de sinalização do PI3K, em células cultivadas de carcinoma epidermóide: correlação com a expressão das proteínas AKT, beta-catenina, ciclina D1 e PTEN"***, de responsabilidade da Pesquisadora **Katiuchia Uzzun Sales**, sob orientação do Professor Doutor **Décio dos Santos Pinto Júnior**.

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

São Paulo, 17 de agosto de 2004

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