FELIPE TORQUATO SALLES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E MECANISMOS DE AÇÃO DA
PROTEÍNA Akt EM CÉLULAS CULTIVADAS DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE BUCAL HUMANO**

São Paulo

2005

Felipe Torquato Salles

**Análise da expressão e mecanismos de ação da proteína akt em células
cultivadas de carcinoma epidermóide bucal humano**

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior

São Paulo
2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salles FT. Análise da expressão e mecanismo de ação da proteína Akt em células cultivadas de carcinoma epidermóide bucal humano [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, com todo o amor e esforço aqui depositados, à minha família. Carlos, Elisa e Fernanda, desde o início formamos somente um, e assim continuará, pois não consigo enxergar de outro jeito.

Katiuchia

Minha referência

Meu apoio

Meu espelho

Nossa vida

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço ao Prof. Décio, além da orientação, toda a convivência como pessoas que tivemos, desde a época em que sem me conhecer me deu a chance de mostrar minhas capacidades, e aos poucos tornar-se orientador em definitivo. Assim como há passos em que por mais firme que seja a perna não é possível dá-los sozinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ney Soares de Araújo, que além de obviamente permitir-me cursar este programa, foi aquele que sempre me demonstrou, através da convivência como orientado, e depois como aluno, quão valioso é o empenho que empregamos em todas e quaisquer tarefas, a fim de constituí-las obras sólidas e bem-acabadas.

À Profa. Dra. Vera Cavalcanti de Araújo, que além de mostrar-me o caminho da seriedade, sempre constituiu-se referência às conquistas que ainda pretendo obter, e que virão certamente a materializar-se.

Ao Dr. Bechara Kachar do NIDCD NIH, pela oportunidade, seriedade e pela forma com que me acolheu.

Aos Profs. Drs. da disciplina de Patologia Bucal Andréa Mantesso, Fábio Nunes, Marília Martins, Marina Magalhães e Suzana Souza, por todo o aprendizado que me proporcionaram, apoio ao meu curso e principalmente convivência e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger por todo o incentivo e inabalável apoio, desde o início desta trajetória. À sempre atenciosa Vanessa Freitas, companheira de curso no início, e fonte de inúmeras soluções.

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques, minha primeira orientadora, que me acolheu na Patologia Bucal e possibilitou-me descobrir meu verdadeiro caminho.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram durante estes anos aqui em São Paulo, em especial minha tia Maria do Rosário, pelo apoio constante.

Aos meus amigos destes já nove anos em São Paulo, desde 26 de fevereiro de 1996, primeiro dia de aula na graduação aqui desta Faculdade, em especial ao Deco, Lílían, Rolhão, Angie, Fly,

Patrícia, Jacob, Kulik, Veri e Júlio. Incrível como nossos caminhos tortuosos e divergentes são como as retas paralelas que se encontram no infinito.

Aos meus amigos de Lorena, que me acompanham desde o começo da vida propriamente dita e que foram os responsáveis por essa percepção de vida e crescimento que desenvolvemos todos. Fernando, Rafael, Helinho, Rodrigo Galvão, Carolina, Ana Cândida.

Os colegas do curso são aqueles com quem passamos a maior parte do tempo e dividimos nossas experiências, sucessos e dissabores. Por isso, a eles agradeço por se constituírem na força motriz que moveu meu entusiasmo. Rogério Castilho, Cristiane Squarize, Ricardo Mesquita, Karen Hiraki, Arlindo Aburad, Filipe Modolo, Patrícia Cury, Tatiana Libório, Carol, Renata Tucci, Aymann Nassif, Carlos Barboza, Juliana Kawamura, Luciana Matizonkas, Márcia Gorisch, Adriana Neves, Márcia Campos, Thais Acquafreda, Paulo Braz, Marina, yonara.

Aos funcionários da disciplina, o quê dizer, além de que sem eles não seria possível que tudo funcionasse? Néia, Zilda, Nair, Patrícia, Bia, e em especial à Gleice, Edna, Graça e Elisa, nunca esquecerei toda a ajuda que vocês me deram.

À FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto (02/13191-4).

John, Paul, George e Ringo, pelas horas de companhia que me fizeram durante a redação desta tese e que me têm feito por toda a vida.

Por último, registro aqui o maior agradecimento que posso fazer ao meu grande amigo Sérgio de Melo Alves Jr. Alguém que eu admiro pelo que faz, pelo que é, e que certamente será amigo até o fim. E também ao grande Rhoner Gonçalves, alguém em quem reconheci um irmão.

Salles FT. Análise da expressão e mecanismo de ação da proteína Akt em células cultivadas de carcinoma epidermóide bucal humano [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

RESUMO

Como neoplasia maligna que mais acomete a cavidade oral, o carcinoma epidermóide gera infinidade de estudos acerca de sua gênese e progressão. O variado perfil genético e protéico observado leva a freqüente insucesso nas terapias adotadas, contribuindo para pobres prognósticos. Este estudo visa compreender melhor o papel da proteína Akt, tida como chave para a proliferação de diversas neoplasias, frente ao estímulo das células derivadas de carcinoma epidermóide humano em cultura (HaCat, HN6, HN19, HN30, HN31) com EGF 10ng/ml e TGF β 5ng/ml. Para tanto, analisou-se a expressão de pAkt, ciclina D1, Bad, caspase-3 e PTEN, através de imunofluorescência, western-blot e imunoprecipitação. Os resultados mostraram aumento da expressão de pAkt e ciclina D1 frente ao tratamento com EGF, bem como diminuição de Bad e PTEN, com exceção de HN31. A imunoprecipitação revelou neste caso que pAkt previne a apoptose através de inativação direta de Bad. Já nas células tratadas com TGF β , obtivemos resultados diferentes do esperado para este supressor de tumor. A expressão de pAkt mostrou-se aumentada nas linhagens celulares, mas estável em HN19 e HN31. Ciclina D1 mostrou aumento em HN6 e HN30, manutenção em HaCat e HN19 e diminuição em HN31. HaCat mostrou queda dos níveis de caspase-3 e Bad, manutenção em HN6, aumento em HN30, aumento somente de Bad em HN31

e HN19 com níveis inalterados após o tratamento para ambas as proteínas. Estes achados sugerem o importante papel desempenhado pelo EGF nas linhagens de carcinoma epidermóide estudadas, e como esta via é importante candidata a ser visada em tratamentos quimioterápicos. A ação do TGF β mostrou discrepâncias, revelando seu comportamento dúbio frente os diversos tipos celulares, e sugerindo possível relação entre este receptor e a via do pAkt, o que requer estudos mais apropriados. A baixa ocorrência de apoptose também reforça esta possibilidade, mostrando como a via do Akt é essencial para a progressão neoplásica e pode estar relacionada a mais eventos celulares do que já sabido.

Palavras-chave: Akt – Carcinoma epidermóide – Carcinogênese – Cultura celular – Ciclo celular – EGF - TGF β

Salles FT. Analysis of the expression and pathways of Akt protein in human squamous cell carcinoma cultured cells [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma raises a great interest regarding carcinogenesis and its proliferative pathways, due to the high incidence and poor prognosis. The broad genetic and proteic profiles contribute to this poor prognosis. The present study aims to better comprehend the role played by pAkt, key protein for the development of many neoplasms. Cell lines derived from oral squamous cell carcinoma (HaCat, HN6, HN19, HN30 and HN31) were induced with 10ng/ml EGF and 5ng/ml TGF β . The expressions of pAkt, cyclin D1, Bad, caspase-3 and PTEN were analyzed through immunofluorescence, western-blot and immunoprecipitation. Results showed higher pAkt and cyclin D1 expression after EGF treatment, as well as a decrease in Bad and PTEN levels, except for HN31. Immunoprecipitation revealed that pAkt prevents apoptosis through Bad direct inactivation. However, TGF β treatment revealed different results, from what expected for this tumor suppressor. pAkt expression revealed to be increased in all cells lines, but stable for HN19 and HN31. HaCat exhibited decreased levels of caspase-3 and Bad, which were unaltered in HN6, augmented in HN30. HN31 revealed only Bad increased levels, and no alterations in HN19. These findings suggest the crucial role played by EGF stimulation in the studied cell lines, and a good candidate to be targeted by chemotherapeutical approaches. TGF β treatment showed discrepancies, revealing diverse behaviors in the different cell lines. An existing relation between TGF β

receptors and pAkt pathway may not be discharged, requiring further studies. The low occurrence of apoptosis reinforces this possibility, showing how important is Akt and related pathways for neoplastic progression, and its possible relation to cellular events not described to date.

Keywords: akt – Squamous cell carcinoma – Carcinogenesis – Cell culture – Cell cycle – EGF – TFG β

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 – Presença dos receptores para EGF e TGF β nas linhagens celulares..... 59

Figura 5.2 – Resultados em imunofluorescência dos grupos tratados..... 60

Figura 5.3 – Western blots obtidos das linhagens celulares 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	proteína akt
BSA	bovine serum albumin (Albumina de Soro Bovino)
CEB	carcinoma epidermóide bucal
DME	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco)
EGF	epithelial growth factor (Fator de Crescimento Epitelial)
ILK	integrin-linked kinase (Proteína kinase ligada a integrina)
PBS	phosphate saline buffer (Tampão Fosfato Salino)
SDS	sodium dodecil sulphate (dodecil sulfato de sódio)
pH	potencial hidrogeniônico
PDK	fosfatidilinositol -dependent kinase (proteína kinase fosfatidilinositol-dependente)
PI3K	fosfatidilinositol-3 kinase
PIP	phosphatidilinositolphosphate (fosfatidilinositolfosfato)
PMSF	phenylmethysulphonylfluoride (fenilmetilsulfonilfluoreto)
PTEN	phosphatase and tensin homolog (Homólogo a fosfatase e tensina)
Rpm	rotações por minuto
TGF	transforming growth factor (fator de crescimento transformador)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama
μg	micrograma
μl	microlitro
%	por cento
Ca	cálcio
Cm^2	centímetros quadrados
CO_2	dióxido de carbono
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
Mg	magnésio
ml	mililitros
NaCl	cloreto de sódio
NaF	fluoreto de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Carcinoma epidermóide	18
2.2 Akt: estrutura, mecanismos e via de ação	21
2.3 Akt e apoptose	23
2.4 Akt e ciclo celular	24
2.5 Akt: invasão e transição epitélio-mesenquimal	28
2.6 Akt e EGFR	32
2.7 Akt e TGF β R	34
2.8 Perspectivas terapêuticas	37
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
5 RESULTADOS	49
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

O Carcinoma Epidermóide (CEC) é a neoplasia maligna de origem epitelial que mais acomete a cavidade oral, sendo portanto uma questão relevante em saúde pública, devido ao número de indivíduos que atinge. Numerosos têm sido os estudos que visam compreender sua etiologia e patogênese, e infelizmente poucos os avanços obtidos em termos concretos. Continua sendo de vital importância o diagnóstico e intervenção precoce.

No presente trabalho, realizamos estudo em células em cultura, visando obter dados que esclarecessem o mecanismo de sobrevivência destas células neoplásicas através da proteína Akt. O Akt pertence à família das Proteínas Kinases B (PKBs), e evidências na literatura têm apontado sua importância nos mecanismos de sobrevivência e proliferação celular em processos fisiológicos e também em neoplasias. Pela escassez de dados referentes à sua participação em carcinomas epidermóides bucais, decidimos empreender este estudo. As linhagens celulares utilizadas foram HaCat (controle), HN6, HN19, HN30 e HN31.

Para avaliar sua participação nos mecanismos de proliferação celular, foi observada através de western-blotting e imunofluorescência, a expressão do pAkt (Akt fosforilado) e da ciclina D1, além de PTEN e Bad frente à estimulação das células em cultura com EGF. Já em relação à sua participação no bloqueio da apoptose, a comparação entre células estimuladas a controle foi avaliada através de imunoprecipitação, para saber se Akt se conjuga às proteínas Bad ou Caspase-3, indicando sua participação em estágios pré ou pós-mitocondriais da apoptose.

Um outro grupo sofreu indução de apoptose através do TGF β 1, e analisados os níveis das proteínas pAkt, ciclina D1, Bad e caspase-3, para se verificar se a via do TGF β em células

cultivadas de carcinomas epidermóides bucais interfere na ação do Akt. A indução de apoptose foi visualizada através de kit fluorescente Anexina V.

Os resultados mostraram que nas células estimuladas com EGF houve maior expressão quantitativa do pAkt e também da Ciclina D1, demonstrando que nestas células a via do EGF atua na proliferação celular através do Akt, que por sua vez atuará no ciclo celular através da Ciclina D1.

Já nas células que sofreram tratamento com TGF β 1, foi também observado aumento na expressão de Ciclina D1 em HaCat, HN6 e HN30, com níveis praticamente inalterados em HN19 e diminuídos em HN31. Em relação aos níveis de pAkt, este sofreu aumento significativo apenas em HN30. HN30 também passou por aumento, mas não expressivo. Já as demais linhagens, não apresentaram alterações em seus níveis de pAkt.

Estes achados tornam-se úteis na compreensão dos mecanismos que tornam as células do carcinoma epidermóide, metastáticas ou não, mais inclinadas à sobrevivência e proliferação. Além disso, a via do Akt, como vem sendo cada vez mais destacado, mostra-se de suma importância na compreensão de processos neoplásicos em geral, e uma boa candidata a sofrer ação de quimioterápicos que a visem.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão destina-se a abordar de forma direta e concisa os tópicos relacionados ao assunto abordado nesta tese. Seu maior objetivo é proporcionar uma visão geral e facilitar a compreensão do vasto campo a ser analisado. Divide-se em tópicos que visam organizar e de certa forma encadear os diversos aspectos tratados. São eles: 1. Carcinoma epidermóide; 2. Akt: estrutura, mecanismos e vias de ação; 3. Akt e apoptose; 4. Akt e ciclo celular; 5. Akt: invasão e transição epitélio-mesenquimal; 6. Akt e EGFR; 7. Akt e TGF β R; 8. Perspectivas Terapêuticas.

2.1 Carcinoma epidermóide

O Carcinoma Epidermóide Bucal (CEB) é a neoplasia maligna mais freqüentemente encontrada na boca representando 95% do total (JORDAN; DALEY, 1997; SAPP; EVERSOLE; WYSOCKI, 1997), e é a sexta dentre todas as várias neoplasias que afetam o ser humano (PARKIN; PISANI; FERLAY, 1993). Pacientes acima dos 40 anos são os mais acometidos, apresentando maior incidência com o decorrer da idade, e mais no sexo masculino do que no feminino (3:1) (NEVILLE et al., 1995; SAPP; EVERSOLE; WYSOCKI, 1997). No entanto, a incidência dessa neoplasia em adultos jovens e mulheres vem crescendo segundo levantamentos feitos na última década (MACFARLANE et al., 1994).

Cerca de 350.000 novos casos de CEB são diagnosticados anualmente em todo o mundo

(BORING; SQUIRES; TONG, 1992) e a sobrevida média destes pacientes gira em torno de cinco anos, com grande parte dos sobreviventes tornando-se portadores de disfunções estéticas e funcionais (SIDRANSKY, 1995; SILVERMAN, 1988; VOKES et al., 1993). Os índices de sobrevida do CEB são bem menores que os de outras neoplasias como as de mama, cólon, reto, rim e pele (TODD; DONOFF; WONG, 1997).

No Brasil, recente estudo de Wünsch-Filho (2002) verificou a ocorrência de carcinomas de boca e orofaringe nas cinco regiões geográficas. Foram encontrados dois padrões distintos de ocorrência desta neoplasia: estes dois padrões foram definidos como Norte (que inclui as regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste) e Sul (incluindo as regiões Sul e Sudeste). A incidência variou entre os dois padrões, sendo maior no Sul, acima de 15 por 100.000. Também em relação à taxa de mortalidade, o número de 3 por 100.000 encontrado no padrão Sul superou o do padrão Norte. Isso pode ser explicado, segundo o autor, pela maior presença de fatores de risco específicos, como fumo, álcool, churrasco e erva-mate, incluindo também higiene e nutrição. Outro fator a ser considerado para o prognóstico da doença é o diagnóstico em estágio já avançado, que pôde ser verificado em grande parte dos casos.

O tratamento do CEC freqüentemente resulta em perda ou comprometimento da fala, mastigação e deglutição, além da possibilidade de disfunções ou perda da articulação do ombro, deformidade estética, e decorrências psicológicas. Um dos grandes responsáveis por este tratamento tão custoso ao paciente é a falta de subsídios existentes para se apontar eficazmente a evolução esperada de cada lesão isolada. Apesar de ser possível se traçar prognósticos a partir de dados como região afetada, envolvimento de linfonodos e tamanho do tumor, não há como se explicar satisfatoriamente os diferentes comportamentos que essa neoplasia apresenta (MÉNDEZ et al., 2002). Necessário se faz, portanto, que os mecanismos moleculares e genéticos envolvidos sejam mais esclarecidos, a fim de que o tratamento final e a própria prevenção tenham maior

alcance e eficiência. Técnicas como “microarrays” vêm permitindo a obtenção dos diferentes perfis de expressão gênica nas neoplasias, para que se façam correlações mais precisas com o comportamento clínico.

Os dados referentes à carcinogênese, aventando qual sua possível etiologia e os mecanismos relacionados permanecem ainda pouco claros (JEFFERIES; FOULKES, 2001). Mesmo com o advento de técnicas mais aprofundadas, como a biologia molecular, o único fato que permanece evidente é a associação do álcool, fumo e radiações ultravioleta como fatores etiológicos (WÜNSCH-FILHO, 2002). Os maiores indicadores de prognóstico permanecem sendo o estadiamento e a graduação histológica de malignidade. No momento do diagnóstico, maior precisão pode ser ainda obtida quando o envolvimento dos linfonodos regionais é avaliado.

O caráter genético do CEB é algo bem estabelecido, onde se observam múltiplas alterações envolvendo oncogenes, genes supressores de tumor e os genes que são responsáveis pelo reparo do DNA. Os fatores ambientais, quando associados a estes genes, podem acarretar um mau funcionamento, com conseqüente perda de controle das funções celulares, como divisão, diferenciação, senescência e apoptose, atribuindo à neoplasia suas características (TODD; DONOFF; WONG, 1997; WILLIAMS, 2000). Os genes supressores de tumor geralmente são envolvidos na oncogênese, e mutações e/ou deleções podem provocar perda de sua função. Como estes genes normalmente impedem uma proliferação celular desenfreada, sua desregulação pode levar a aumento de proliferação, perda de coesão, invasão local e metástases (ARAÚJO et al., 1997; SQUARIZE; CASTILHO; PINTO JR, 2002; WILLIAMS, 2000). Achados mais recentes já vêm mostrando que as alterações genéticas presentes diferem nos CECs entre si, e que os carcinomas ainda iniciais já carregam as alterações que propiciarão o desenvolvimento e invasão por carcinomas mais avançados (MÉNDEZ et al., 2002). Este mesmo estudo, utilizando-se de “microarray”, analisou a expressão gênica em diversos carcinomas epidermóides de boca, e

encontrou superexpressão de genes envolvidos em diversas funções celulares, como proliferação, angiogênese e invasividade, além de proteínas do citoesqueleto e extracelulares. Entretanto, não houve diferença significativa na expressão destes genes entre diferentes carcinomas, com exceção de apenas um caso.

2.2 Akt: estrutura, mecanismos e vias de ação

O estudo da família de proteínas Akt iniciou-se quando dois genes, Akt1 e 2, foram identificados como homólogos humanos do oncogene viral v-Akt, responsável por leucemia em ratos (STAAL, 1987). Por ter similaridades com as proteínas kinases A (PKA) e C (PKC), é conhecida como proteína kinase B/Akt e os membros da família chamados PKBa (Akt1), PKBb (Akt2) e PKBg (Akt3) (BELLACOSA et al., 1991; COFFER; WOODJET, 1991; JONES; JAKUBOWICZ; HEMMINGS, 1991).

O Akt possui domínios distintos, nos quais estão localizados os sítios de ligação que vão promover sua ativação. Os três sítios possuem um domínio PH idêntico, seguido por domínios catalíticos que são semelhantes (FERGUSON et al., 2000; LIETZKE et al., 2000) aos das proteínas PKA e PKC (ANDJELKOVIC et al., 1995; JONES et al., 1991). A ativação do Akt vai depender da disponibilidade intracelular de PI3-K (fosfatidilinositol-3 kinase). Através de sinais extracelulares, esta molécula é recrutada para a membrana plasmática onde fosforila uma outra molécula, PIP2, passando a PIP3. Esta é responsável pelo recrutamento do Akt sendo regulada negativamente pelo PTEN (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Uma vez na membrana plasmática, Akt sofre fosforilações em diferentes sítios, por PDK-1 (fosfatidilinositol kinase-

dependente 1), PDK-2 (fosfatidilinositol kinase-dependente 2), e principalmente ILK (Kinase ligada a integrina) (NICHOLSON; ANDERSON, 2002; TESTA; BELLACOSA, 2001). Estudos recentes têm apontado que esta ativação necessita de fosforilação do Akt em sítios conhecidos como Y315 e Y 326 e que são dependentes da família de proteínas kinases *src* (CHEN et al., 2001), um grupo conhecido por estar freqüentemente superexpresso em células neoplásicas (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Por outro lado, Akt pode sofrer ação de fosfatases, e assim ter sua expressão estimulada ou reprimida.

O maior conhecimento e entendimento da participação do Akt em processos de proliferação celular e apoptose levaram a um maior interesse em seu estudo, visando compreender de que maneira esta família de proteínas se relaciona com a carcinogênese e como ocorre a regulação de sua expressão. O estudo pioneiro sobre a participação do Akt em neoplasias (STAAL, 1987) não detectou mutações ou alterações genéticas, mas sim sua superexpressão. Em várias neoplasias analisadas, foram encontradas superexpressões das diferentes formas do Akt (THOMPSON et al., 1996; NAKATANI et al., 1999), mas os estudos em material clínico ainda são escassos, quanto aos níveis expressos e sua ativação (NICHOLSON; ANDERSON, 2002).

Após sua ativação na membrana plasmática, Akt passa a ter localização citoplasmática e nuclear (ANDJELKOVIC et al., 1997; BORGATTI et al., 2000; DUFNER et al., 1999; FILIPPA et al., 2000; MEIER et al., 1997), regulando principalmente a apoptose e a proliferação celular. Sua participação é crítica na sobrevivência das células frente a diversos estímulos (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999), ligando-se a diversos substratos. Regula positivamente fatores anti-apoptóticos e negativamente fatores pró-apoptóticos. Como exemplos, Akt promove inativação de membros da família de proteínas *forkhead* (FKHR), impedindo que haja transcrição dos genes pró-apoptóticos *Bim* e *Fas-L* (BRUNET et al., 1999; DIJKERS et al., 2000). De maneira contrária, também promove a ativação do fator de transcrição NF-kB, que induz os genes

c-IAP-1 e c-IAP-2, que promovem sobrevivência celular.

2.3 Akt e apoptose

Akt pode fosforilar diretamente proteínas pró-apoptóticas ao invés de atuar indiretamente na transcrição gênica. É o caso das proteínas *Bax* e *Bad*, reconhecidamente apoptóticas. Ao fosforilar *Bad* em um resíduo específico, esta última é sequestrada no citoplasma por uma proteína da família 14-3-3, sendo impedida de exercer seu efeito pró-apoptótico (DATTA et al., 1997; DEL PESO et al., 1997). A proteína *Bax* sofre uma outra ação do Akt, através da qual não se modifica em sua estrutura terciária e não pode se ligar à membrana mitocondrial (YAMAGUCHI; WANG, 2001). Em ambos os casos citados acima, nota-se uma ação pré-mitocondrial do Akt. Outra faceta de sua ação anti-apoptótica se revela por sua ação também em fases pós-mitocondriais da morte celular, ao agir sobre as proteínas caspase-3 e caspase-9, efectoras finais do processo (ZHOU et al., 2000). Chen et al. (1998), ao induzir apoptose em diversas linhagens celulares utilizando-se de TGF β , verificaram que o Akt impede a ação da caspase-3, sem poder apontar se este efeito se dá direta ou indiretamente através de alguma proteína intermediária. Ao estudar *in vivo* a expressão dos receptores de TGF β em carcinoma epidermóide de boca, Paterson et al. (2001), verificaram que há diminuição na expressão desses receptores, fazendo com que as células deixem de sofrer estímulos inibitórios de proliferação. Cardone et al. (1998), demonstraram ação direta do Akt sobre a pró-caspase-9, inibindo-a.

2.4 Akt e ciclo celular

Com relação à proliferação celular, o Akt também possui amplo espectro de ação ao promover ou impedir a ação de diversas proteínas relacionadas ao ciclo celular. Entre as proteínas envolvidas na proliferação celular relacionadas aos mecanismos de ação do Akt podemos citar p21, p27, mdm2 e p53 (ASSOIAN; SCHWARTZ, 2001; NICHOLSON; ANDERSON, 2002; TESTA; BELLACOSA, 2001; ZHOU et al., 2001). De um estudo preliminar, conduzido por Cheng et al. (1997), observou-se que na superexpressão de Akt2, havia progressão e aceleração do ciclo celular, e possivelmente Akt tem papel na progressão entre as fases G1-S. Esta progressão é controlada pela proteína pRB (retinoblastoma), que suprime a transcrição dos genes responsáveis por esta passagem. As proteínas CDKs (ciclina kinase-dependentes) podem fosforilar pRB e promover a progressão do ciclo celular. A função das CDKs é regulada por uma família de proteínas inibitórias, dentre as quais se destacam p21 e p27 (ASSOIAN; SCHWARTZ, 2001). Em células estimuladas à proliferação, p21 e p27 passam do núcleo para o citoplasma, onde são fosforiladas pelo Akt (TESTA; BELLACOSA, 2001; ZHOU et al., 2001). Por consequência, o ciclo celular deixará de sofrer o “controle” promovido por estas proteínas.

A ciclina D1 (CD1), outra importante molécula envolvida na proliferação celular também está sujeita à ação do Akt. Vem sendo demonstrada sua superexpressão em neoplasias (BARTKOVA et al., 1994) e evidências vêm apontando um papel do Akt em todas as esferas em que CD1 pode atuar, seja na transcrição gênica, translação do mRNA e estabilidade protéica (GILLE; DOWNWARD, 1999; MUISE-HELMERICKS et al., 1998; TAKUWA et al., 1999).

Um ponto importante a ser considerado, é que a superexpressão de ciclina do tipo D ainda

não está comprovadamente ligada à hipótese de que a célula em questão torna-se independente de estímulos mitóticos. A disponibilidade da ciclina D1 é controlada por um balanço entre RAS/RAF/MAPK (síntese) e RAS/PI3K/Akt (estabilidade), aliado a GSK-3 β (degradação) (MALUMBRES; BARBACID, 2001). Ciclina D1 também não é indispensável para a passagem da célula para G1, pois células que não possuem esta molécula podem proliferar, provavelmente devido à alta homologia entre as três ciclinas do tipo D (FANTL et al., 1995; SICINSKI et al., 1995). No entanto, é notável a relação entre a superexpressão de CD1 e a facilitação da passagem para G1 e a conseqüente proliferação (MALUMBRES; BARBACID, 2001). Os níveis de ciclina D1 são controlados durante a fase G2, quando a célula “toma a decisão” de continuar proliferando ou não. Os baixos níveis de CD1 durante a fase S são necessários para a síntese de DNA, e para o próprio estímulo de aumentar novamente os seus níveis para a fase G2. É na fase G2 que ras vai agir, levando ao aumento de CD1. Sob este ponto de vista, a fase G2 torna-se extremamente importante para a continuidade do ciclo, e possui como um de seus moduladores-chave a própria ciclina D1 (STACEY, 2003). Um novo composto chamado CKBM mostrou-se eficaz em induzir células neoplásicas à apoptose, através de parada do ciclo celular em G2 e ativação de p21, p53 e 14-3-3sigma (LUK et al., 2005). Também é interessante a relação demonstrada entre NF- κ B e a fase G2, pois em células em que há aumento da expressão desta proteína, a parada do ciclo em G2 torna-se mais longa e a célula torna-se capaz de retomar o ciclo celular (WUERZBERGER-DAVIS et al., 2005).

Esta molécula apresenta um comportamento complexo e variado, na medida em que atua em diversas esferas do comportamento celular. Seu papel está relacionado não somente com proliferação, mas também com inibição do crescimento, senescência e apoptose. Esses mecanismos, obviamente, são altamente susceptíveis ao tipo celular e ao contexto em que este se

encontra. Pagano et al. (1994), demonstraram que altos níveis de CD1 em fibroblastos de pulmão (IMR-90) levam à parada do ciclo celular por ligar-se e inativar o PCNA. Outro mecanismo possível é a inativação da atividade ciclina/cdk. Em células epiteliais de mamíferos, esta inibição da proliferação também foi verificada (HAN et al., 1999). Em células senescentes, o aumento de ciclina D1 também é verificado, porém sem evidências sugestivas se este fenômeno é causa ou consequência. Em relação à apoptose, esta ciclina também parece desempenhar seu papel. Estudos realizados em tumores de mama de origem humana (HBL-100) e de camundongo (HC11) demonstraram relação da superexpressão de ciclina D1 com supressão da multiplicação celular, por prolongamento da fase S (HAN et al., 1996). Estes autores sugerem que esta superexpressão de CD1 sensibiliza as linhagens celulares à indução de apoptose por privação de soro, tratamento com hidroxiuréia ou com o inibidor da proteína quinase C CGP41251. Estudos realizados em linhagem celular de glioma (U87 MG) mostraram que superexpressão ectópica de ciclina D1 bloqueia a entrada na fase S e promove a parada do ciclo celular, conjuntamente com aumento na expressão de pRB e p21 (SAWA et al., 1998). Achados estes verificados também em linhagem de carcinoma de esôfago (EC 109) (DOKI et al., 1997). A participação de p53 neste processo ainda permanece obscura. A elevação dos níveis de p27 em células HC11 também co-apresenta-se com altos níveis de CD1, indicando aumento da susceptibilidade à apoptose, já que p27 leva à parada do ciclo em G1. Porém, não é estabelecida a real participação de p27 neste processo.

Em estudos realizados em células epiteliais transformadas derivadas de brônquios, foi demonstrado que a ação de retinóides pode contribuir para a redução da atividade proliferativa através da degradação da ciclina D1. Esta ação dá-se também por uma redução nos níveis dos receptores de EGF, considerados também cruciais para a ativação da ciclina D1 (PETTY; DRAGNEV; DMITROVSKY, 2003).

Ainda em relação à proliferação celular, outras duas proteínas que têm suas ações sujeitas a fosforilação do Akt são mdm2 e p53 (MAYO; DONNER, 2001). Um dos mais conhecidos e estudados genes relacionados a apoptose e carcinogênese, o p53, promove a parada do ciclo celular, podendo levar a célula à morte. Mayo e Donner (2001), mostraram que em células em cultura estimuladas à proliferação, mdm2 sofre fosforilação pelo Akt no citoplasma, e passa para o núcleo, agindo sobre p53, impedindo a transativação. Isto ocorre porque o complexo mdm2/p53 é transportado para o citoplasma, local em que o p53 vai ser degradado. Os autores atentam para o fato de que nesta via citada, Akt permite apenas a passagem de mdm2 para o núcleo e que este efeito será pleno quando houver regulação negativa de outros supressores de tumor.

Pela exposição destes dados, notamos como a compreensão do ciclo celular é um elemento-chave para o estudo das neoplasias, e como seu funcionamento e progressão encontra-se diretamente relacionado à expressão e ação de pAkt, molécula central no controle destes eventos celulares.

2.5 Akt: invasão e transição epitélio-mesênquimal

A chamada transição epitélio-mesênquimal é uma peça-chave para a compreensão do comportamento das neoplasias. É aí que o caráter de malignidade realmente se manifesta, pois são as células desta frente que se tornam capazes de se adaptarem fora do ambiente gerado pela membrana basal. Isto as torna capazes de invadir os tecidos subjacentes e de disseminarem-se metastaticamente, através de vasos sangüíneos e linfáticos. Dentre os principais aspectos relacionados a estas células, aqueles que mais se destacam são as moléculas de adesão, citoesqueletais e metaloproteinases.

Entre as moléculas de adesão, as mais estudadas em carcinomas epidermóides são a Caderina-E e a β -catenina. A primeira é uma proteína transmembrânica responsável pela adesão e morfogênese dos tecidos epiteliais (ODA; TSUKITA; TAKEICHI, 1998; TAKEICHI, 1991). Liga-se ao citoesqueleto através de moléculas chamadas cateninas (HAJRA; FEARON, 2002). Em carcinomas epidermóide orais, a perda da expressão de Caderina-E correlaciona-se com invasão e metástase (BAGUTTI; SPEIGHT; WATT, 1998; MATTIJSEN et al., 1993), o que não ocorre com o gene CDH1, que a codifica, sugerindo que o micro-ambiente é que determina estas alterações (HIROHASHI, 1998). Em junções aderentes, β -catenina liga a Caderina-E ao citoesqueleto de actina através da interação com a α -catenina (HAJRA; FEARON, 2002). Junto a esse papel desempenhado na adesão celular, β -catenina também se relaciona à via do Wnt, e tem seus níveis citoplasmáticos regulados pelo complexo APC/Axina/GSK-3 β (POLAKIS, 2000). Wnt é uma família com diversas proteínas, e não somente associadas à multiplicação celular. Taki M et al. (2003) recentemente demonstraram a participação dos componentes Wnt-4 e Wnt-

5a em processos de motilidade, adesão e invasão na transição epitélio-mesenquimal. Utilizando clones altamente invasivos (MSCC-Inv 1 e MSCC-Inv 2), Kudo et al., 2004, encontraram metilação da Caderina-E e degradação da β -catenina nestes clones, além de metilação freqüente da Caderina-E e perda de expressão da β -catenina de membrana nas áreas mais invasivas e metastáticas em cortes histológicos. Estes autores ainda sugerem que a perda de β -catenina ligada à membrana prejudica a ligação célula/célula, favorecendo metástase. No entanto, β -catenina não parece ter o núcleo como destino, mas sim a degradação. Este estudo também mostrou que Caderina-E pode sofrer metilação e a célula tornar-se metastática, mas este processo se reverte quando a célula metastática estabelece-se.

Além de alterações em seus mecanismos de adesão, as células tumorais também adquirem alterações fenotípicas, como expressão de proteínas restritas a células mesenquimais. Uma das proteínas mais estudadas é a vimentina, filamento intermediário característico de células mesenquimais, mas que se mostra presente em carcinomas, correlacionando-se com seu grau de malignidade (HENDRIX et al., 1996). Islam et al. (1996) demonstraram que a expressão de Caderina-N (normalmente encontrada em células mesenquimais) encontra-se aumentada e relaciona-se com perda de expressão de Caderina-E. No entanto, não há relação entre a expressão de vimentina e de Caderina-N em células de carcinoma epidermóide (SCC1) (ISLAM et al., 2000). Caderina-P, outra molécula de adesão homóloga à Caderina-E também possui expressão inversamente proporcional à diferenciação celular em carcinomas epidermóides. Lo Muzio et al. (2004), demonstraram a perda gradual desta molécula durante o processo de invasão tecidual e metástase. Em relação a este complexo papel desempenhado pelas caderinas e cateninas na estabilidade das junções celulares, outra peça parece ser decisiva neste processo: a fosfatase PTEN. Sua inativação durante a progressão de tumores favorece a disseminação das neoplasias.

Comprovadamente age por estabilização da Caderina-E, reorganização de citoesqueleto e integrinas e por reverter a ação de caderinas mesenquimais (KOTELEVETS et al., 2001). Junto a isso há observações de que a sobrevivência e motilidade associadas à Caderina-N em culturas de melanomas envolvem a via de sinalização de PI3K e pAkt, dando-lhes caráter proliferativo e “libertando-as” do controle dos queratinócitos (LI; SATYAMOORTHY; HERLYN, 2001). PTEN também age inibindo a ação da β -catenina livre, impedindo-a de migrar para o núcleo, bem como de aumentar a quantidade intracelular de GSK-3 β , e diminuindo a atividade de PKB/Akt (PERSAD et al., 2001).

Um outro fator identificado que promove invasividade e metástase em células de carcinoma epidermóide é o AMF (Autocrine Motility Factor), capaz de levar à célula à quimiotaxia (motilidade direcional) e quimiocinese (motilidade aleatória) (LIOTTA et al., 1986). Niinaka et al. (2002), caracterizaram linhagens celulares de carcinoma epidermóide bucal com diferentes potenciais metastáticos em relação à sua motilidade. AMF foi relacionado à capacidade metastática das linhagens, bem como envolvida com a expressão de vimentina. Isto seria de relevância, pois AMF age através da PKC, que fosforila resíduos de vimentina e assim possibilita a transdução do sinal de motilidade.

É bem sabido que o receptor de EGF (EGFR) é um importante marcador de malignidade em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Sua presença associa-se a um aumento do potencial metastático destas células (SHIMIZU et al., 2001). Lorch et al. (2004) já verificaram a estreita relação entre a ativação de receptores de EGF e a perda de coesão de células epiteliais, o que favoreceria sua capacidade invasiva. Esta ação dá-se principalmente por aumento da solubilidade das moléculas de Caderina-E, o que favorece a perda de adesão. Além disso, há que se lembrar que ocorre aumento da disponibilidade intracelular de β -catenina. Em células de

carcinoma de mama (MCF7 e MCF7-5R), Spencer et al. (2000) demonstraram a importância da presença do receptor ErbB2 para ação do EGF nestas células, aumentando sua capacidade migratória e invasiva. Aliado a estes achados, Zhou et al. (2004) observaram a forte relação entre a ativação de receptores ErbB2 e a fosforilação de Akt em câncer de mama *in vitro* e *in vivo*.

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

Por fim, o envolvimento de Akt em tantos processos considerados críticos à estabilidade e sobrevivência celulares, sugere que tenha papel destacado na carcinogênese de diversas neoplasias (TESTA; BELLACOSA, 2001). A diversidade de processos através dos quais as células adquirem seu fenótipo invasivo e mais agressivo implica no conhecimento de diferentes vias protéicas. Entre estas, nota-se participação também de PKB/Akt, envolvida principalmente na ativação das células através de receptores de EGF, e também na produção de metaloproteinases, moléculas cruciais na invasão de tecidos adjacentes.

2.6 Akt e EGFR

Recentemente, estudos vêm mostrando que os ligantes para os receptores de EGF, bem como seu mRNA, possuem maior expressão em neoplasias de cabeça e pescoço e regiões adjacentes, quando comparadas à mucosa íntegra (GRANDIS et al., 1998). Estes autores ainda sugerem que a expressão do EGFR poderia ser utilizada como um marcador imunoistoquímico prognóstico, assim como bloqueadores para este receptor seriam úteis para se impedir a proliferação destas células. Esta via do EGFR também pode conferir radioresistência e proporcionar capacidade de recorrência às neoplasias de cabeça e pescoço, através da ativação de PI3K, que proporcionaria a ação do Akt (GUPTA et al., 2001). Em 2002, este mesmo grupo mostrou através de estudos conduzidos em células e em tecidos que há relação entre a expressão de Akt e insucessos no tratamento de neoplasias de cabeça e pescoço, mostrando mais uma forte evidência a favor do papel dessa proteína nesta modalidade de carcinogênese (GUPTA et al., 2002).

A relação entre o Akt e o EGFR com o estadiamento das neoplasias não é bem estabelecida ainda em estudos recentes. Gupta et al. (2002), mostraram que não há relação direta entre a expressão de pAkt e o estágio T. Já Grandis et al. (1998) constataram que não há relação significativa entre os níveis de EGFR e TGF α com a situação dos linfonodos cervicais.

Em relação à carcinogênese e invasão tecidual, EGF vem sendo demonstrado como presente em processos diversos. Encontra-se superexpresso em mais de 90% dos casos (GRANDIS; TWEARDY, 1993), confirmando-se ótimo candidato ao alvo de drogas que inibam seu mecanismo de ação (HERBST; HONG, 2002; JANMAAT; GIACCONE, 2003).

A inibição do EGFR confere não só uma diminuição da capacidade proliferativa das células, mas também é capaz de atribuir-lhes maior coesão tecidual, pois há formação de

desmossomos e aumento da adesão célula/ célula mesmo em baixas concentrações de cálcio, onde a adesão intercelular é mínima (LORCH et al., 2004). Este estudo mostrou também que esta coesão não se dá por aumento na concentração das caderinas, mas sim por um maior recrutamento desta proteína à membrana plasmática, por conseqüente favorecimento do agrupamento destas moléculas de adesão.

A ativação do receptor de EGF também exerce influência em outra importante via de proliferação celular, levando a troca de nucleotídeos na proteínas ras, que participa da ativação de proteínas da família Raf, e posteriormente da MAP ou ERK kinases 1/2 (MEK 1/2) e ERK 1/2 (JELINEK et al., 1997; RENSHAW; REN; SCHWARTZ, 1997). Um forte inibidor da via da MAP kinase é o PTEN, segundo estudo conduzido por Gu, Tamura e Yamada (1998), em células derivadas de glioblastoma (U-87MG, DBTRG-05MG e U-373MG). Essa intervenção provavelmente se dá através do ras, já que a ativação do EGFR não parece requerer a ação de PI3K, fazendo com que seja pouco provável que também haja desfosforilação do Akt quando há estímulo por EGF. Estes autores também sugerem ação-chave do PTEN em desfosforilação do complexo Shc/ GRb2 e da fak, o que leva à inativação do ras, sem afetar a via de sinalização do Akt ou JNK. Quando há ativação do ras, o fator de transcrição atingido no final é o ETS2, que tem genes-alvo que vão da ciclina D1 a fatores de invasividade como uPA e MMP3. Weng et al. (2003), estudando a ação do PTEN em linhagem de câncer de mama (MCF-7) estimuladas com EGF, observaram que esse estímulo também leva à fosforilação tanto do ETS2 quanto do Akt. Os autores encontraram nesta linhagem uma resistência à ação do PTEN quando do estímulo por EGF, sustentando a idéia de que a ação deste supressor é seletiva para certas tirosina-kinases e o seu papel nos tumores dos diferentes sistemas é variável.

2.7 Akt e TGF β R

Um agente relacionado à apoptose e que apresenta ação sobre a via do Akt é o TGF β (CHEN et al., 1998; CHEN et al., 1999). Este polipeptídeo extracelular é importante no controle do crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular (DERYNCK, 1994; KINGSLEY, 1994).

A família de proteínas TGF β comporta ainda as BMPs e activinas. Regulam o desenvolvimento dos tecidos, ditando sua proliferação, migração e diferenciação. Seu papel inibitório na proliferação celular explica sua atuação como supressor de tumor em carcinomas, apesar de sua expressão também contribuir para progressão de tumores (DERYNCK; ZHANG, 2003). O mecanismo de funcionamento destas proteínas dá-se basicamente pela ativação do receptor TGF β RI, que se liga na membrana plasmática ao receptor TGF β RII, e juntos iniciam cascata de eventos que culminam na ativação das Smads e finalmente transcrição (MASSAGUÉ, 2000; MOUSTAKAS; SOUCHELNYTSKYI; HELDIN, 2001). As muitas interações possíveis entre Smads e os receptores de superfície permitem grande quantidade de estímulos, o que leva a uma multiplicidade de fatores de transcrição regidos por estas proteínas efetoras. Evidências recentes têm apontado que TGF β não exerce sua função apenas através destas moléculas (DERYNCK; ZHANG, 2003). Numeradas de 1 a 8, as Smads podem tanto ser promotoras quanto inibidoras da via de sinalização do TGF β (ITOH et al., 2000). A número 7, por exemplo, pode atuar reprimindo a ação de TGF β quando há ativação de receptores de EGF, ativação de NF- κ B pelo TNF α ou do INF γ através de STAT (ativador de transcrição) (MASSAGUÉ, 2000; ITOH et al., 2000; MOUSTAKAS; SOUCHELNYTSKYI; HELDIN, 2001). A ativação da via do TGF β

persiste por até 4h após ligação do estímulo aos receptores, e este estímulo prolongado é o que mantém Smads no núcleo, onde regulam a expressão gênica (INMAN; NICOLAS; HILL, 2002). TGF β inibe a progressão do ciclo celular, controlando seus reguladores, além de genes como C-myc (CHEN et al., 2002). Há que se lembrar também que TGF β pode exercer sua ação não somente através das Smads, mas também através das vias da MAPK, que podem regular ação de Smads mas também não se relacionar à transcrição (DERYNCK; ZHANG, 2003). Estudos também mostraram que em células com TGF β RI mutado há ativação da MAPK em resposta ao TGF β (YU; HEBERT; ZHANG, 2002).

Muito se tem aventado sobre a importância da expressão de TGF β na progressão de neoplasias, inclusive do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Estudo conduzido por Paterson et al. (2001), avaliou a expressão em cortes histológicos de TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3 juntamente com seus receptores TGF β R I e II em epitélio normal, tumores primários e metástases em linfonodos. Observaram que a expressão das isoformas de TGF β não varia significativamente nos espécimes estudados. No entanto, em relação aos receptores, houve perda significativa da expressão de TGF β RII em tumores primários e mais ainda nos linfonodos metastáticos. Este achado contrasta com Kim et al. (1999), que descreveram a perda da expressão de TGF β RII somente em estágios tardios da carcinogênese.

Mais recentemente, Logullo et al. (2003) conduziram estudo avaliando a associação de TGF β 1 com o prognóstico em carcinoma epidermóide. A maioria dos casos analisados mostrou negatividade, enquanto os tecidos adjacentes continuavam com expressão normal de TGF β 1. Outra característica importante é que a significância e a presença da expressão varia entre os tumores, e esta heterogeneidade pode explicar porque tal expressão não pode se relacionar ao prognóstico.

A perda de resposta celular ao TGF β 1 e alterações em seus receptores foram associados à disseminação metastática em carcinoma epidermóide bucal induzido em ratos (DAVIES et al., 1999). Estudando o comportamento de diversas linhagens derivadas de carcinoma epidermóide em ratos atímicos, Prime et al. (2004) observaram que o padrão de disseminação foi semelhante ao constatado em seres humanos, e que a capacidade metastática foi maior nas linhagens resistentes ao efeito inibitório de TGF β . Na verdade, o papel do TGF β como molécula supressora de tumor vem sendo contestado. Esta já é considerada também molécula pró-oncogênica, podendo contribuir para progressão de células malignas, invasão e metástase (WAKEFIELD; ROBERTS, 2002). Observações mostram que carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço tendem a se tornar indiferentes ao efeito antiproliferativo. Ainda em relação a esta neoplasia, a secreção de TGF β 1 induz um fenótipo miofibroblástico no estroma adjacente, comumente observado em frentes de invasão. Estas células também produzem maiores níveis de HGF, promovendo a invasão pelas células de carcinoma epidermóide através de proteínas da membrana basal (LEWIS et al., 2004). Sob este aspecto, o seu efeito pró-carcinogênico, TGF β também é alvo de estudos relacionados a integrinas. A integrina α v β 6, particularmente, assume importante função neste processo. A interação entre TGF β 1 e α v β 6 ocorre por intermédio de uma molécula chamada LAP (latency-associated peptide). Nos estágios mais avançados da carcinogênese, este peptídeo torna-se mais disponível na matriz extracelular em sua forma imobilizada. Desta maneira, há aumento nos sinais intracelulares para aumento da migração celular e da produção de MMP-9.

Como muitos outros processos e eventos celulares, a via de apoptose iniciada por TGF β pode ser bloqueada pela ação de PI3K/Akt. Em linhagem de hepatoma humano (Hep3B), Chen et al. (1999), demonstraram haver um efeito protetor da IL-6 sobre a ação do TGF β . Dentre os

mecanismos observados, há uma prevenção da ativação da caspase-3 pelo TGF β , além de haver rápida ativação de PI3K e conseqüentemente de pAkt. Este último torna-se então capaz de exercer efeito anti-apoptótico. Esta via PI3K/Akt ainda trabalha em cooperação com STAT3 para mediar este efeito induzido por IL-6.

2.8 Perspectivas terapêuticas

Akt e sua via relacionada vêm se configurando como ótimos candidatos a tratamentos quimioterápicos, devido à forte correlação que parecem apresentar com o CEC e outras neoplasias. Este último tópico visa apontar tratamentos quimioterápicos recentemente apontados na literatura, encerrando a coleção de informações apresentadas sobre a via de ação e importância de Akt e proteínas relacionadas.

Um dos grupos de drogas mais conhecidos é o dos flavonóides, facilmente encontrados no meio-ambiente, que reduzem a incidência de várias neoplasias quando utilizadas. Apesar disso, seus mecanismos de ação ainda não são satisfatoriamente compreendidos. Brown, O'Prey e Harrison (2003) verificaram a efetividade de um flavonóide (morin) sobre a proliferação em culturas de carcinoma epidermóide, e observaram uma redução na atividade proliferativa, e um decréscimo na expressão do pAkt, sendo o mais interessante que esse decréscimo foi muito mais marcante em células de carcinoma que em células da mucosa oral normal. Outro agente flavonóide eficaz é o flavopiridol (PATEL et al., 1998), que age por bloqueio de CDKs, e induz apoptose em linhagens de carcinoma epidermóide resistentes inclusive à radiação.

Outro grupo de agentes químicos que vêm despertando grande interesse é o dos compostos selênicos (CLARK et al., 1998). Estes compostos podem ser utilizados em medicamentos ou suplementos alimentares, e parecem ser mais efetivos na prevenção em indivíduos do sexo masculino. Aplicando um destes compostos (selenodiglutathione) sobre células cultivadas de carcinoma epidermóide, Ghose et al. (2001) verificaram que seu mecanismo de ação não está relacionado à diminuição da expressão do Akt. Os autores verificaram que a indução de apoptose nesse caso ocorre tendo como intermediária a via JNK/cJUN. Nesses casos analisados, os níveis de apoptose obtidos coincidiram com a expressão de Fas-L. Como esta molécula é normalmente constitutiva de células de carcinoma epidermóide, esta pode vir a ser uma explicação da efetividade dos compostos selênicos.

Fresno Vara et al. (2004) revisam uma série de drogas que têm potencial anti-neoplásico, e agem sobre a via PI3K/Akt. Os autores listam uma série de abordagens, que vão desde inibidores de receptores de EGF, como ZD1839 (gefitinib, Iressa; AstraZeneca®) e OSI-774 (erlotinib, Tarceva; OSI Pharmaceuticals®), ainda em fases clínicas iniciais de testes. A segunda vem exibindo melhores resultados que a primeira. Anticorpos monoclonais como o IMC-C225 da Bristol Meyers Squibb® e Clone Systems® (Erbix, Cetuximeb) mostram eficácia clínica já em estudos clínicos de fase II contra carcinoma colorretal. Por último, uma outra droga, conhecida como trastuzumab (Herceptina) desenvolvida pela Genetech® é a que vem mostrando resultados animadores, prolongando o tempo médio de sobrevida de pacientes com carcinomas de mama em aproximadamente 25% (SLAMON et al., 2001). Seu mecanismo de ação provável dá-se pela ativação de PTEN e a conseqüente inativação da via sinalizada por PI3K (NAGATA et al., 2004). Ao ligar-se ao receptor ErbB2, trastuzumab suprime a ação da molécula src sobre PTEN, que fica desfosforilado e impede que PI3K dê início à via sinalizatória que culminará na ativação de Akt

(NAGATA et al., 2004).

Assim, a inativação da via PI3K/Akt é de extrema importância em diferentes neoplasias para que a resistência à quimioterapia seja vencida. Outro clássico inibidor desta via é o wortmannin (POWIS et al., 1994), que tem ação eficaz mesmo em concentrações de nanomolares. Um senão relativo a esta droga é sua solubilidade em solventes orgânicos, fato que é objeto do desenvolvimento de conjugados solúveis em água (WEST; CASTILLO; DENNIS, 2002). Wortmannin também se mostra eficiente potencializador de tratamentos quimioterápicos. Junto dele, outro inibidor desta via é o LY294002, um flavonóide com ação similar ao de wortmannin, porém age antagonizando a transcrição gênica e não possui boa eficácia em linhagens celulares com baixos índices de Akt (WEST; CASTILLO; DENNIS, 2002). Estes autores ainda listam drogas inibidoras de Akt que seriam candidatas a agentes quimioterápicos, porém a citotoxicidade demonstrada ainda é muito alta. CCI-779 é uma outra droga que impede ação de pAkt através da inibição de mTOR, molécula efetora desta via. Possui eficácia em testes *in vivo*, e em culturas celulares mostrou-se efetiva em células knock-out para PTEN e com altos níveis de Akt, provocando parada do ciclo celular na fase G1 (SHI et al., 2002).

Um exemplo a ser citado e lembrado é o da terapia gênica, que consiste na introdução e material genético em determinado grupo celular através de um vetor como um vírus. Um supressor conhecido com mda-7 (melanoma differentiation-associated gene-7) foi identificado (JIANG et al., 1995), e mostrado ser capaz de induzir apoptose em diferentes linhagens celulares (MHASHILKAR et al., 2001). A grande vantagem apresentada tanto em experimentos *in vitro* como *in vivo*, foi a seletividade sobre células neoplásicas em detrimento das normais (SAEKI et al., 2000; SAEKI et al., 2002). Investigando o mecanismo de ação da proteína codificada por este gene em linhagens de carcinoma de pulmão (H1299, A549) e de mama (MDA-MB-453, T47D, MCF-7, SkBr3), Mhashilkar et al. (2003), observaram que mda-7 leva a um aumento de

expressão de genes supressores de tumor como APC, axina e GSK-3 β . Além disso, β -catenina é observada somente em região de membrana citoplasmática, provavelmente pelo aumento verificado nos níveis de Caderina-E. Também há queda de expressão nas proteínas reguladas pela ação da PI3K (inclusive aí Akt), provavelmente por aumentos verificados nos níveis de PTEN.

Por fim, a literatura ainda registra terapias onde quimioterápicos são associados à radioterapia, buscando-se maior eficácia nos tratamentos de pacientes com diversos tipos de neoplasias. Nos últimos anos, com maior compreensão da radiosensibilização em células neoplásicas, novos agentes têm sido desenvolvidos que possibilitam maior sucesso na erradicação de clones após a radioterapia. Rubin Grandis et al. (1998), demonstraram que a inibição de receptores de EGF em carcinoma de cabeça e pescoço não afeta a regeneração de células normais, o que constitui vantagem durante a radioterapia. Inibição da sinalização do EGFR potencializa a ação da radiação ionizante, e torna-se aliada da radioterapia, principalmente através de drogas anteriormente citadas, como trastuzumab, cetuximab e ZD1839 (MA et al., 2003). Além disso, nota-se maior expressão de moléculas pró-apoptóticas (Bax) e expressão reduzida de moléculas anti-apoptóticas (Bcl-2 e STAT-3) (BONNER JA 2000; HUANG; HARARI, 1999). Um inibidor de tirosina kinase conhecido como AEE788 foi usado em trabalho recente sobre carcinomas epidermóides induzidos em línguas de ratos, e mostrou-se eficaz em inibir a proliferação celular, induzir apoptose nas células endoteliais que vascularizam a neoplasia e foi bem tolerada pelos animais (YIGITBASI et al., 2004).

Como esperado, há também as modalidades de tratamento que visam atingir a via de ação de PI3K – PKB/Akt. Akt já foi demonstrado também como promotor de radioresistência em células NSCLC (BROGNARD et al., 2001). Um de seus principais antagonistas, wortmannin, aumenta a responsividade do tratamento radioterápico em tumores de pulmão, bexiga, cólon,

mama, carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, com mutações em ras e ativação de PI3K (PRICE; YOUNELL, 1996). Mais recentemente, Riesterer O et al. (2004), compararam um inibidor de EGFR (PKI 166), um de PKC (PKC 412) e um de VEGF (PTK 787), quanto à sua eficácia sobre a via PKB/Akt em células de tumores epiteliais e em células endoteliais associadas.

Em extensa revisão realizada por Ma et al. (2003), ainda aparecem muitos bons candidatos a quimioterápicos que aumentam a sensibilidade de diversas linhagens celulares e agindo sobre diferentes aspectos. Em relação ao ciclo celular lista-se o flavopiridol, um inibidor reversível de CDKs, que já se encontra em testes clínicos em pacientes com tumores de pâncreas. Com ação análoga, há um composto chamado UCN-01, que inibe CDK-1 e CDK-2, promovendo parada do ciclo em G1. Estudando a ação desta droga em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, Amornphimoltham et al. (2004), ressaltaram sua eficaz ação ao reduzir a multiplicação celular nestas linhagens, graças à redução nos níveis de pAkt. Inibidores de COX-2 também são listados como possíveis agentes, pois vêm sendo relacionados a diversos fenômenos como aumento da radiosensibilidade, diminuição da produção de fatores angiogênicos, e potencialização da apoptose provocada pela radioterapia (MA et al., 2003).

Essa pequena amostra da diversidade de tratamentos disponíveis e em desenvolvimento reflete a diversidade de mecanismos utilizados por células neoplásicas para se ambientarem, multiplicarem e invadir tecidos. Porém, apesar de haver múltiplos efetores finais, as vias iniciais geralmente convergem, e podem constituir-se nos principais alvos para novas terapias.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é analisar a expressão do Akt e seu mecanismo de ação em linhagens celulares derivadas de Carcinomas Epidermóides Bucais (HN6, HN19, HN30), e de carcinoma metastático (HN31), além da linhagem HaCat como queratinócitos normais. As células serão estimuladas à proliferação ou à apoptose para se buscar observar e compreender como a proteína pAkt está expressa e relacionando-se com suas proteínas afins. Desta maneira, buscamos uma melhor compreensão dos fenômenos observados e a possibilidade de se listar possíveis agentes que interfeririam com propriedade nesta importante via de proliferação neoplásica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo celular

Foram utilizadas cinco linhagens celulares de carcinoma epidermóide: HN6, HN19, HN30, HN31 e HaCat como queratinócitos-controle. 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, Oberkochen, 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 removido e separado em tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada uma vez com solução fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS A), pH 7,2. Em seguida, as células separadas com 2ml de solução de tripsina (Sigma®) a 0,25% com EDTA 1mM (Sigma®) durante 5 minutos, a 37°C. A tripsina era inativada com o soro fetal

bovino contido no meio de cultura reservado anteriormente, e as células em suspensão transferidas para um tubo de centrifugação e centrifugadas a 300g por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células era ressuspensionado em 1ml de meio de cultura. Alíquotas da suspensão distribuídas em frascos de cultivo de 25 cm² contendo 6ml 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 aqui realizados, as células foram divididas em três grupos experimentais: 1. Controle, sem aplicação de quaisquer substâncias; 2. Estimuladas à proliferação, com aplicação de EGF (10ng/ml) ; 3. Estimuladas à apoptose, através de aplicação do TGF- β (5ng/ml).

4.2 Indução de apoptose

Para indução de apoptose, utilizamos o TGF- β 1 (Santa Cruz® Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) seguindo protocolo traçado por Chen et al. (2001), aplicado em várias linhagens celulares, e que interfere na via de sinalização do Akt. Depois de cultivadas sobre lamínulas de vidro, as células sofriam deprivação de soro por 24 horas e depois tratadas com ou sem TGF- β 1 (5 ng/ml) por 18h.

4.3 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, seguido da incubação dos anticorpos primários anti-rabbit pAkt 1:50 (Santa Cruz®), anti-mouse Ciclina D1 1:100 (Sant Cruz®), anti-mouse Bad (Santa Cruz®), ou anti-mouse Caspase-3 por 45 minutos. Após nova lavagem, era feita incubação com anticorpo secundário antimouse ou anti-rabbit biotinilado (Vector® Laboratories, Burlingame, California, USA) com diluição de 1:50 por 30 minutos (), e Texas Red Estreptavidina 1:200 (Vector®) por 30 minutos.

As lamínulas eram montadas sobre lâminas de vidro com meio de montagem Vectashild (Vector®), analisadas e fotografadas ou capturadas em microscópio de fluorescência (Zeiss® Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Para verificação de células apoptóticas, utilizamos o kit Annexin V (Santa Cruz®). As células cultivadas sobre lamínulas de vidro sofreram de privação de soro por 24 horas e depois tratadas com ou sem TGF- β (5 ng/ml) por 18 h. O protocolo para a marcação das células foi seguido de acordo com as instruções do fabricante. As células apoptóticas foram visualizadas através de microscopia de fluorescência.

4.4 Western-blotting

Após a sub-confluência (70% da área cultivável), o meio era removido, as células lavadas 2X com PBSA a frio e colocadas sobre o gelo (4 °C). Foi adicionado 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 incubadas por 10 min nesta temperatura sob agitação. O lisado centrifugado a 15000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante aliquoteado e estocado a -80 °C. As proteínas do lisado foram quantificadas com o kit BCA Protein Assay Kit (Pierce® Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) (Reagente B + Reagente A 1:50 + 2-20µl de amostra, analisados em espectrofotômetro). As alíquotas do lisado eram misturadas contendo 20µg de proteína total, com tampão de amostra para concentração final de 1X. Em seguida, ferviam-se as amostras por 5 min e então eram submetidas a SDS-PAGE, sendo feita eletroforese a 100V por 150 minutos, em gel de acrilamida a 10%. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope (BioRad®, Hercules, Califórnia, USA). Para 10 ml de gel de acrilamida a 10 % eram usados 4ml de água, 3,325ml de acrilamida/bisacrilamida a 40%, 2,5ml de separating buffer pH 8,8, 0,1ml de SDS a 10%, 0,1ml de APS a 20% e 4µl de TEMED. Para o gel de empilhamento usavam-se 3,4ml de água, 0,85ml de acrilamida/bisacrilamida a 40%, 0,625ml de stacking buffer pH 6,8, 0,05ml de SDS a 10%, 0,05ml de APS a 20% e 5µl de TEMED.

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi feita por eletro-transferência úmida em aparelho especial (Hoefer® miniVE, Amersham® Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Com o tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39mM

Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) utilizado como recomendado pelo fabricante. A transferência foi feita com 30mA por 120min. Após a transferência, a membrana era submetida à fase de bloqueio ou lavada e seca para posterior reação.

Para a imunorreação, foi feito bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em pó desnatado em TBST por 1-2h em temperatura ambiente, sob agitação. No caso do anticorpo pAkt, o bloqueio foi feito com BSA 1% em TBST, devido à interferência que proteínas do leite podem exercer em sítios de ligação para proteínas fosforiladas. Em seguida, a solução de bloqueio era removida lavando-se a membrana com TBST. O anticorpo de interesse (anti-pAkt, anti-ciclina D1, anti-bad ou anti-caspase-3) era diluído em solução de bloqueio e aplicado de acordo com o tempo recomendado pelo fabricante, e mantido à temperatura ambiente sob agitação por 90 min. Seguiam três lavagens para remoção do anticorpo não-absorvido com TBST sob agitação e à temperatura ambiente. O anticorpo secundário era então aplicado por 1 hora, diluído em solução de bloqueio e depois lavado em TBST 2X por cinco min cada.

A detecção colorimétrica foi feita através do kit Opti 4CN (Bio-Rad®). Uma parte do diluente concentrado Opti-4CN era adicionada a nove partes de água deionizada. Foram utilizados 0,25ml para cada cm² da membrana. Para cada 10ml do diluente preparado adicionava-se 0,2ml de substrato Opti-4CN, misturando-se bem e colocados sobre a membrana. A membrana era incubada no substrato por até 30min, depois lavada em água deionizada por 15min, e pronta para documentação.

4.5 Co-imunoprecipitação

Após passar pelas condições experimentais propostas, as células plaqueadas eram colocadas no gelo, o meio de cultura removido, e o lisado celular preparado como descrito previamente. Para as reações de imunoprecipitação foi utilizado o kit Seize Classic G (Pierce®), que se utiliza de tubos capazes de separar e eluir com propriedade as proteínas precipitadas. O anticorpo primário pAkt foi incubado durante 1h sob agitação leve nos lisados celulares. O gel de proteína G era então preparado no tampão de lavagem e imobilizado no copo localizado dentro do tubo de centrifuga. O lisado celular contendo o imunocomplexo era então colocado no copo onde estava o gel de proteína G. A incubação era feita por 45 minutos sob leve agitação. Então, a mistura foi centrifugada, ficando no copo apenas a proteína G e o imunocomplexo capturado. Duas lavagens com o tampão de lavagem eram realizadas. Para eluição, utilizou-se o tampão de eluição fornecido no kit. 190 µl eram adicionados o tubo levemente agitado por dez vezes. Então procedia-se à centrifugação e obtenção da solução eluída, contendo apenas pAkt e quaisquer outras moléculas que porventura estivessem ligadas a ele. A proteína G restante era lavada e guardada para posterior utilização, segundo instruções do fabricante. As amostras foram então analisadas por western-blotting, segundo protocolo já descrito. Na técnica SDS-PAGE, foram usados anticorpos contra as proteínas BAD (Santa cruz®) e Caspase-3 (Santa Cruz®) a fim de verificar se são substratos do pAkt.

5 RESULTADOS

Aspecto das células em microscopia de fase invertida. HaCat (Figura 5.1 l), HN6 (Figura 5.1 m), HN19 (Figura n), HN30 (Fig 5.1 o) e HN31 (Figura 5.1 p).

5.1 Células tratadas com EGF

Neste primeiro grupo experimental, as culturas de carcinoma epidermóide sofreram ação de EGF (10ng/ml) durante 18h após prévia deprivação de soro por 24h. Finalizado este processo, utilizamo-nos da imunofluorescência para avaliar a localização das proteínas ciclina D1 e pAkt, e do western-blotting para avaliar a expressão quantitativa não só de pAkt e da ciclina D1 mas também do pró-apoptótico Bad e de PTEN. Todas as células exibiram presença do receptor para EGF em imunofluorescência (Figuras 5.1 a, b, c, d, e).

5.1.1 western-blotting

O western-blotting consistiu na separação por eletroforese dos lisados contendo a quantidade total de proteínas obtidas após o tratamento. Foi realizada a técnica SDS-PAGE em gel de acrilamida a 10%, e subsequente transferência para membrana de nitrocelulose (Amersham®). As amostras protéicas utilizadas foram de 20µg para cada linhagem (HaCat, HN6,

HN19, HN30 e HN31 em condições normais e seus respectivos pares tratados com EGF). Assim, com quantidades totais idênticas, pudemos comparar a expressão das já citadas proteínas nos grupos experimentais. Em relação à ciclina D1 (Figura 5.3b), pudemos observar aumentos em todas as linhagens, exceto em HN19. Nesta linhagem, os níveis desta proteína mantiveram-se estáveis, sem um aumento expressivo. Já HaCat nota-se um aumento pouco pronunciado mas existente, refletindo também menor responsividade desta linhagem ao tratamento. Em HN31, os níveis de ciclina D1 exibiram também pequeno aumento, porém com quantidade inicial já bem elevada em relação às outras linhagens. HN6 e HN30 foram as que mostraram um maior incremento na expressão desta proteína do ciclo celular frente ao tratamento com EGF. HN6 partiu dos níveis mais baixos de proteína para exibir um dos mais pronunciados, enquanto HN30 já exibia altos níveis que foram reforçados pela exposição ao fator de crescimento. A expressão da proteína pAkt também mostrou grande aumento entre os grupos controle e aqueles tratados com EGF (Figura 5.3a). De certa forma, mostrou-se semelhante ao padrão observado com a ciclina D1, porém com suas peculiaridades. De uma maneira geral, os níveis iniciais detectados foram baixos ao serem comparados com os níveis de pAkt obtidos após o tratamento. Como ocorreu com a expressão da ciclina D1, HN19 não evidenciou um grande aumento quantitativo de Akt fosforilado, exibindo apenas uma mudança pouco detectável. Já nas demais linhagens, pudemos observar uma ampliação mais destacada nos níveis desta proteína. As células HaCat passaram de um nível quase indetectável para uma expressão razoavelmente destacada. Dentre as células restantes, HN30 era a que exibia uma quantidade inicial mais elevada, mas que ainda assim foi alvo de grande incremento, assim com HN6 e HN31. Na primeira o aumento no nível de pAkt também foi bastante pronunciado, assim como em HN31, que não possuíam níveis iniciais da mesma grandeza de HN30. A observação da expressão do pró-apoptótico Bad (Figura 5.3c) visava ver a interferência do tratamento com EGF sobre esta proteína, já que se sabe que

este é um possível alvo de pAkt em diversos tipos celulares. Em relação a esta proteína, foi possível notar decréscimo em sua expressão comparando-se as células tratadas com as linhagens não-expostas ao EGF. Interessantemente, esta diminuição não foi uniforme e nem em todos os grupos. HaCat mostrou queda de expressão em seus altos níveis iniciais de Bad, assim como HN6. HN19, apesar de não expressar essa proteína nos grupos controle em mesma quantidade que nas demais linhagens, foi a que exibiu a maior queda relativa em seus níveis, chegando muito perto de não ser mais detectada. HN30 também mostrou diminuição nos níveis de Bad, partindo de níveis iniciais muito altos desta proteína. Já HN31 foi a que exibiu tendência contrastante das demais, com ligeiro aumento dos níveis de Bad após tratamento com EGF. Por último, foram observados os níveis de PTEN nas linhagens celulares após tratamento com EGF (Figura 5.3d). Sabe-se que esta é uma proteína que age impedindo a fosforilação de pAkt e sua consequente ação. Assim, os grupos analisados exibiram novamente padrões diferentes entre si, desta vez assemelhando-se ao que foi observado com Bad. De uma maneira análoga, foi observado discreto declínio da expressão de PTEN em todas as linhagens celulares, exceto em HN31. HaCat apresentou dentre todas as mais altos níveis iniciais, mas mostrando queda na expressão de PTEN, bem como HN6, com um padrão de expressão bem semelhante. HN30 também foi uma linhagem que exibiu alto índice inicial desta proteína, porém com uma queda existente, mas menos acentuada em seus níveis. HN19, por sua vez, foi a que exibiu a maior queda na expressão de PTEN, sugerindo nesta linhagem grande influência da via do EGF sobre a expressão de PTEN. Por fim, HN31, contrariamente à tendência demonstrada pelas demais células, exibiu ligeiro aumento na expressão desta proteína que exerce função supressora tumoral.

5.1.2 imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência tiveram por objetivo esclarecer a localização intracelular das proteínas tidas como alvo neste estudo. A localização de certas proteínas pode ser indicativa de sua função, como por exemplo, uma proteína que está inativa junto à membrana plasmática mas que ao deslocar-se para o citoplasma ou núcleo pode sofrer ativação ou mesmo adquirir nova função.

Apesar de não tão significativas e elucidativas quanto os achados mostrados pelo western-blotting, as imagens em imunofluorescência revelam a disposição destas proteínas nas células, e como estas podem ser afetadas ou não pelo tratamento com EGF (10ng/ml por 18h). Em HaCat observamos localização tanto citoplasmática quanto nuclear de pAkt nas células controle (Fig 5.2-1), o que se repete nos grupos tratados com EGF (Figura 5.2-11). No entanto, nas tratadas há mais presença citoplasmática que no controle, sugerindo um espectro de ação mais amplo. Em relação à ciclina D1 (Figuras 5.2-6 e 5.2-16), a localização desta proteína muda pouco, exceto pelo controle exibir células com localização exclusivamente citoplasmática. A linhagem HN6 exibe presença quase que exclusivamente nuclear de pAkt tanto nas células tratadas (Figura 5.2-12) quanto nas células controle (Figura 5.2-2). Assim como da ciclina D1 (Figuras 5.2-7 e 5.2-17), com pronunciada localização nuclear, sem evidência de células que possuam marcação apenas citoplasmática. HN19 segue o mesmo padrão de HN6. Faz-se necessário lembrar que esta célula possui uma morfologia diferente das demais, crescendo nos frascos em ilhotas, que dificilmente coalescem. Por isso as imagens com aspecto ligeiramente diferente. Em todas as áreas analisadas, tanto em células tratadas como em células controle, a localização exclusiva de pAkt (Fig 5.2-3 e 5.2-13) e da ciclina D1 (Figuras 5.2-8 e 5.2-18) eram exclusivamente nucleares,

sem sinal de presença citoplasmática. Em HN30, a presença de pAkt em células controle (Figura 5.2-4) e em células submetidas ao EGF (Figura 5.2-14) também mostrou-se predominantemente nuclear, com raras células exibindo sinais citoplasmáticos de sua presença. Ciclina D1 exibiu o mesmo comportamento, estando restrita aos núcleos celulares em ambos os grupos (Figuras 5.2-9 e 5.2-19). Na última linhagem analisada, HN31, também não diferiu deste comportamento prévio, porém com diferenças a salientar. Sobre a expressão de pAkt, quase que exclusivamente nuclear no grupo controle (Figura 5.2-5), no grupo tratado passa a ter em grande número de células uma localização exclusivamente citoplasmática (Figura 5.2-15), o que pode estar relacionado a seu mecanismo de ação nesta linhagem. Já ciclina D1 manteve sua localização nuclear em ambos os grupos, tratado com EGF (Figura 5.2-20) ou controle (Fig 5.2-10). Nas fotomicrografias notam-se células que não expressam ciclina D1 nuclear por estarem sofrendo inibição por contato. É necessário salientar-se também que os experimentos foram visualizados em células sub e semi-confluentes. Isso possibilitou diferenciar-se os efeitos da inibição por contato, principalmente sobre ciclina D1. Em relação ao pAkt, em ambas as situações não se notou diferença imposta por estas condições.

5.1.3 co-imunoprecipitação

Neste experimento, a proteína pAkt foi imunoprecipitada a partir dos lisados obtidos com o kit Seize como descrito previamente, e então procedeu-se o SDS-PAGE contra as proteínas Bad e Caspase-3, para se avaliar se pAkt imobiliza diretamente alguma destas proteínas durante o estímulo das células com EGF. O que se observou foi a ausência de marcação para a caspase-3,

mas houve imunorreatividade para Bad, que exibiu discretas bandas em todas as linhagens, e marcação mais pronunciada em HN6 (Figura 5.3e).

5.2 Células tratadas com TGF β 1

Neste segundo grupo experimental, as culturas de carcinoma epidermóide sofreram ação de TGF β 1 (5ng/ml) durante 18h após sofrerem deprivação de soro por 24h. Finalizado este processo, utilizamo-nos da imunofluorescência para avaliar a localização das proteínas ciclina D1 e pAkt, e do western-blotting para avaliar a expressão quantitativa não só de pAkt e da ciclina D1 mas também dos pró-apoptóticos caspase-3 e Bad. Todas as células exibiram imunomarcação para o receptor TGF β RII (Figuras 5.1 f, g, h, i, j).

5.2.1 western-blotting

O protocolo para obtenção dos lisados, separação das proteínas totais (20 μ g por amostra) e transferência para membrana de nitrocelulose foram realizadas como já descrito na seção inicial. Os resultados obtidos evidenciam o papel dúbio exercido pelo TGF β 1 em relação às neoplasias. A expressão de pAkt nestas linhagens tratadas (Figura 5.3f), contrariamente ao que se poderia esperar, sofreu aumento, e não diminuição. Houve aumento visível em HaCat, HN6 e HN30. Já

HN19 exibiu níveis baixos desta proteína em relação às demais linhagens, mantendo-se praticamente estável, ou seja, indiferente ao tratamento com TGF β 1. HN31 mostrou baixos índices de pAkt, que mantiveram-se praticamente também inalterados após o tratamento. Em relação à ciclina D1 (Figura 5.3g), os resultados apresentados pelas linhagens celulares divergiram, apontando reações conflitantes frente ao estímulo empregado. HaCat exibiu um nível praticamente estável desta proteína, com um nível baixo comparado às demais linhagens, assim como HN19. Estas células também não demonstraram níveis altos de ciclina D1, e que permaneceram inalterados frente ao tratamento com TGF β 1. Já HN6 mostrou-se bastante responsiva ao tratamento, com expressivo aumento na quantidade de ciclina D1, já que partiu de níveis pouco detectáveis em condições controle. HN30 foi a linhagem que partiu um dos maiores índices iniciais relativos desta proteína, sofrendo também grande aumento em sua expressão, de maneira bem similar à última linhagem apresentada. Por fim, contrastando com os demais achados observamos HN31 partir de altos índices de ciclina D1 para níveis bem menos expressivos, próximo daquilo que se observa em HaCat e HN19. Estes achados mostram como o mecanismo de ação de TGF β 1 é bastante variável e suscita reações diversas nas diferentes células. A análise das proteínas pró-apoptóticas também revelou discrepâncias na reação das linhagens de carcinoma utilizadas. Caspase-3 (Figura 5.3h), importante efetora pós-mitocondrial, e ainda não relacionada ao pAkt em células de carcinoma epidermóide, revelou um padrão de expressão variável. Nas células HaCat, houve queda visível em seus níveis, contrariamente de HN30, onde observou-se aumento na expressão de caspase-3, em padrão quase inverso ao da primeira. HN6 e HN19 foram linhagens que apresentaram altos índices iniciais relativos desta proteína, porém se mostraram inalterados e muito similares entre si mesmo após o tratamento com TGF β 1. HN31, por fim, não se mostrou possuidora de altos níveis iniciais, e que também se

mantiveram inalterados frente ao estímulo. A expressão de Bad (Figura 5.3i), por sua vez, teve um padrão diferente do observado com caspase-3. Este pró-apoptótico pré-mitochondrial exibiu-se dramaticamente reduzido em HaCat após o tratamento, já que as células controle exibiam altos índices iniciais. HN6, como ocorreu com a proteína analisada anteriormente, apresentou níveis relativos altos de Bad, que se mantiveram inalterados, assim como em HN19, porém com menor expressão relativa. HN30, com níveis iniciais semelhantes ao de HN6 exibiu aumento na expressão de Bad, assim como HN31, que não havia apresentado alterações em seus níveis de caspase-3. Estes achados indicam a multiplicidade de mecanismos estimulados pelo TGF β 1, e que suscitam a possibilidade de ativação de diversas vias efetoras.

5.2.2 imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência tiveram continuidade neste grupo experimental, numa tentativa de ajudar a esclarecer o mecanismo de ação assumido por pAkt e ciclina D1 frente ao estímulo com TGF β 1 (5ng/ml) por 18 horas.

Em HaCat, foi bastante importante a verificação da presença de pAkt exclusivamente em núcleo celular (Figura 5.2-21), enquanto as células controle evidenciavam situação também citoplasmática. Já a ciclina D1 (Figura 5.2-26) teve uma diminuição da sua expressão nuclear, podendo ser vista em grande número de células, confluentes ou não, com localização puramente citoplasmática. HN6 foi uma linhagem que praticamente manteve as características das células controle naquelas tratadas. Em pAkt, partiu-se de uma localização tanto nuclear quanto

citoplasmática em todas as células observadas que se manteve nas induzidas (Figura 5.2-22). Ciclina D1 também manteve um mesmo padrão, porém com deposição mais acentuada da proteína no citoplasma nas tratadas (Figura 5.2-27). Em HN19, as células que simplesmente cresceram sem nenhum tipo de tratamento exibiam localização exclusivamente nuclear tanto para pAkt como para ciclina D1. Passando aos grupos induzidos com TGF β 1 observamos menos células exibindo pAkt tanto em núcleos como citoplasma (Fig 5.2-23), mas ciclina D1 manteve seu padrão de expressão inalterado (Figura 5.2-28). As células HN30 também não revelaram grande alteração na localização ou expressão das proteínas, conservando nas células tratadas uma expressão exclusivamente nuclear tanto para ciclina D1 (Figura 5.2-29) quanto para pAkt (Figura 5.2-24). Isso se manteve tanto em células confluentes quanto isoladas. Por fim, HN31 foi uma das linhagens que exibiu maiores alterações em relação à localização de proteínas frente ao estímulo com TGF β 1. Quanto a pAkt, partimos de uma situação inicial com todas as células apresentando localização tanto em núcleo quanto em citoplasma, e que após o tratamento muitas delas passaram a exibir um padrão somente citoplasmático (Figura 5.2-25). Ciclina D1 também se mostrou sensível a um rearranjo nas células após o tratamento, passando a uma situação predominantemente citoplasmática (Figura 5.2-30), com raras células exibindo localização nuclear, somente aquelas bem isoladas.

5.2.3 observação de apoptose

Após o tratamento das células com TGF β 1 (5ng/ml) por 18 horas, foram realizados testes com o kit anexina V (Santa Cruz®) para verificação da ocorrência ou não do fenômeno. O kit baseia-se em coloração direta, sem necessidade de fixação das células, agindo por 15 minutos, contendo anexina V e iodeto de propídio para verificação dos núcleos.

A linhagens mais responsivas ao TGF β 1 foram HN30 e HN31 (Figuras 5.4d, e). Na primeira, os índices de marcação foram baixos, na ordem de 2%, como evidenciado na figura. Já HN31 mostrou-se bastante responsiva ao tratamento, com grande número de células exibindo marcação pela anexina, na ordem de 30%. As demais linhagens, HaCat, HN6 e HN19 (Figuras 5.4a, b, c), independentemente do estado de confluência não exibiram traços de apoptose, apenas poucas células exibindo marcação pelo iodeto de propídio.

Figura 5.1- Evidenciação dos receptores para TGFBRII, EGFR e o aspecto usual das células em microscópio de fase invertido.

Figura 5.2- Localização de pAkt e ciclina D1 nas células controle, tratadas com EGF 10 ng/ml e TGFB1 5ng/ml.

Figura 5.3- Expressão das proteínas estudadas em western-blot e imunoprecipitação, junto dos resultados observados com o kit anexina V.

6 DISCUSSÃO

A alta incidência do carcinoma epidermóide, somada ao seu curso clínico freqüentemente desfavorável motivam sem-número de pesquisas relacionadas à sua patogênese. A heterogeneidade de eventos celulares e moleculares constitui grande desafio ao estabelecimento de terapias efetivas. Desta maneira, uma associação mais precisa entre dados clínicos, celulares e moleculares pode levar a uma maior compreensão sobre o surgimento e progressão desta neoplasia. O presente trabalho buscou analisar a expressão e o mecanismo de ação de proteínas relacionadas tanto a proliferação quanto à morte celular, traçando possíveis correlações entre estas, seus possíveis papéis desempenhados e a importância que isso pode acarretar na carcinogênese e proliferação.

O desvendamento cada vez maior dos padrões de expressão gênica, principalmente através dos microarrays possibilita a correta identificação dos genes envolvidos, e que junto com a compreensão das vias protéicas envolvidas pode levar a terapias efetivas. Os fatores ambientais, quando associados a muitos dos oncogenes já conhecidos que levam à perda das funções celulares são ainda a maior explicação para a ocorrência e desenvolvimento desta neoplasia (TODD; DONOFF; WONG, 1997; WILLIAMS, 2000).

Nesse contexto, a maior compreensão sobre ativação e os efeitos desencadeados pela via do Akt parece ser de suma importância na carcinogênese de diversas neoplasias (NAKATANI et al., 1999; NICHOLSON; ANDERSON, 2002; STAAL, 1987; THOMPSON et al., 1996). Isso se deve à sua presença upstream em todos os eventos de que participa, pois sua ativação se dá junto à membrana plasmática, logo após o estímulo aos receptores tirosina quinase (ANDJELKOVIC

et al., 1997; MEIER et al., 1997; DUFNER et al., 1999; BORGATTI et al., 2000; FILIPPA et al., 2000). Segundo ainda estes trabalhos, após este recrutamento na membrana plasmática, pAkt passa a localização tanto citoplasmática quanto nuclear, agindo sobre diversos sinalizadores, como promotores e inibidores do ciclo celular e também da apoptose.

O EGF revela-se um importante promotor da progressão tumoral e carcinogênese. Seus níveis foram relatados como aumentados em neoplasias de cabeça e pescoço em relação à mucosa normal (GRANDIS et al., 1998) e também parece se relacionar à ativação de PI3-K e conseqüentemente de Akt (GUPTA et al., 2001). Neste estudo, utilizamos um tratamento com 10ng/ml de EGF em culturas derivadas de carcinoma epidermóide bucal durante 18h, para que o fator de crescimento não pudesse inibir o crescimento celular (NORDBERG et al., 2005). Os resultados obtidos em imunofluorescência não revelaram importantes mudanças na distribuição intracelular tanto de pAkt quanto de Ciclina D1 nas células tratadas em relação ao grupo controle. Sabe-se que pAkt pode se localizar tanto no núcleo quanto no citoplasma, e que sua ativação na membrana plasmática é extremamente efêmera (ANDJELKOVIC et al., 1997). Por se tratarem de células neoplásicas, Akt não irá provavelmente sofrer rearranjo para um sítio específico, mas provavelmente ter uma maior expressão. O mesmo se aplica à Ciclina D1. Molécula conhecida como alvo nuclear de pAkt, possui sempre localização nuclear nas linhagens estudadas, independente do tratamento adotado neste estudo. Desta maneira, os resultados obtidos através de western-blot para as células tratadas com EGF corrobora estes aspectos. O que pudemos observar foi aumento similar das expressões tanto de pAkt quanto de Ciclina D1 em todas as linhagens celulares. Isso indica uma relação direta entre os níveis de pAkt e a indução do ciclo celular através de Ciclina D1. A gama de eventos provocados por pAkt não se restringe ao núcleo celular, e ocorre também no citoplasma. Nossos achados mostraram também a queda na expressão do pró-apoptótico Bad e de PTEN. Bad é diretamente fosforilada e em seguida

seqüestrada por uma proteína da família 14-3-3, não chegando à membrana mitocondrial (DATTA et al., 1997; DEL PESO et al., 1997). Interessante se faz notar seu discreto aumento apenas na linhagem HN31. Isso pode ser indicativo da natureza diversa desta linhagem, visto que foi obtida a partir de um carcinoma epidermóide metastático,. Neste caso, a capacidade invasiva da célula metastática lhe confere capacidade proliferativa diferente de uma célula simplesmente neoplásica. Isso não quer dizer que o efeito do EGF não se faz presente. Pelo contrário, apenas mostra uma nova faceta da ação de pAkt. Estudos demonstram acentuada produção de metaloproteinases estimulada por Akt (THANT et al., 2000), a partir da desestabilização das junções mediadas por caderina-E (MUNSHI et al., 2002). Neste contexto, a expressão diminuída de PTEN nas linhagens celulares após o tratamento com EGF revela a estreita relação ente todos estes eventos. Sua ação comprovadamente estabiliza a caderina-E, e impede a disseminação de neoplasias (KOTELEVETS et al., 2001). PTEN também é responsável pela regulação fisiológica de Akt em células normais, pois regula a ação de PI3-K (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Através dos achados deste trabalho, pode-se traçar interessante correlação. A ativação de receptores tirosina-quinase provoca inativação da proteína PTEN (NAGATA et al., 2004), o que favorece aumento dos níveis de pAkt e de seus alvos, como Ciclina D1. Bad é afetado negativamente, com reduzida expressão e conseqüente favorecimento da viabilidade celular. O ensaio de imunoprecipitação revelou também que há relação direta entre pAkt e Bad, e que pAkt não exerce ação direta sobre a caspase-3, já que esta não foi identificada. Isso não significa que pAkt não age sobre a caspase-3, mas sim que esta ação não é direta. A regulação negativa de PTEN também leva a célula neoplásica a uma maior capacidade invasiva. O caráter a ser adquirido provavelmente dependerá do ambiente em que a célula se encontra, seu estágio de desdiferenciação, levando ao estabelecimento de um maquinário específico para o fim necessário.

O segundo tratamento imposto às linhagens celulares foi com TGF β a 5ng/ml. Esta molécula desempenha papéis controversos, relacionando-se ao crescimento e desenvolvimento celular (DERYNCK, 1994; KINGSLEY, 1994), bem como agindo também sobre a via do Akt (CHEN et al., 1998; CHEN et al., 1999). Estes últimos autores relataram apoptose com o tratamento descrito. Neste trabalho, procuramos realizar tal abordagem a fim de se analisar as prováveis vias de ocorrência de apoptose nestas linhagens frente ao tratamento com TGF β . No entanto, nossos resultados apontaram para direção distinta. O teste de apoptose realizado com o kit Anexina V mostrou a pouca ocorrência nas linhagens estudadas e com índices bastante baixos. A única linhagem que mostrou alguma resposta ao tratamento foi HN31, na casa de 30% de ocorrência. Este achado veio ao encontro dos níveis de proteínas observadas no western-blot. Em todas as células tratadas, pAkt mostrou-se aumentado, exceto na HN31. Isso mostra como TGF β se relaciona, nestes casos, mais ao estímulo do que à repressão da proliferação. Quanto a ciclina D1, os níveis protéicos se mostraram estáveis, exceto pelo notável aumento na HN6 e HN30, e pela diminuição na HN31. Estes resultados levam a interpretações distintas da ação do TGF β . Na HN31 ele realmente exerce seu papel antiproliferativo, o que é confirmado inclusive pelos resultados nos testes de apoptose. Já em relação às outras linhagens, pode-se depreender que o TGF β possui papel estimulatório na proliferação através da ativação de pAkt, mas que nem sempre resultará na superexpressão da Ciclina D1. Outras ciclinas provavelmente são envolvidas, dependendo aí da Smad primariamente ativada. Mas nas HN6 e HN30 esta associação torna-se evidente, mostrando via de ativação semelhante à do EGF. Há que se lembrar que TGF β inibe a progressão do ciclo celular (CHEN et al., 2002), e estes resultados apontam para o questionamento desta afirmação como algo definitivo. Como TGF β também atua sobre a via da MAPK, pode-se considerar que se a célula neoplásica já possui mutações nesta via (o que é

freqüente no carcinoma epidermóide bucal), provavelmente não será responsiva ao seu estímulo. Mais, o TGF β atuaria aí como molécula pró-oncogênica, podendo contribuir para progressão, invasão e metástase, como já reportado (WAKEFIELD; ROBERTS, 2002). A heterogeneidade de expressão gênica e de vias envolvidas na progressão do carcinoma epidermóide bucal corrobora estes achados. A ativação da via PI3K/Akt também possui ação antagonista sobre a via do TGF β (CHEN et al., 1999). Moléculas downstream a esta via, como NF κ B são capazes de estimular a ação de Smads que antagonizam o TGF β , principalmente a 7.

Junto da Ciclina D1 e de pAkt, observamos a expressão de proteínas pró-apoptóticas frente ao tratamento com TGF β . Bad, por ser proteína de ação pré-mitocondrial, e a caspase-3 por ser proteína de ação pós-mitocondrial. Os níveis de caspase-3 mostraram-se praticamente inalterados nas HN6, HN19 e HN31 após os estímulos, diminuindo na HaCat e aumentando na HN30. Já os níveis de Bad tiveram expressão ainda diversa. Na HaCat houve grande redução, HN30 e 31 aumento e nas HN6 e HN19 praticamente não houve alterações. Tais resultados são conflitantes ao que se esperaria, devido às observações prévias de pAkt e Ciclina D1. Os níveis aumentados em HN31 para ambas as proteínas apoptóticas, somados às reduções de pAkt e Ciclina D1 e aos índices de apoptose verificados mostram a susceptibilidade desta linhagem ao tratamento. Já nas demais, a heterogeneidade das vias de sinalização em carcinomas epidermóides torna-se evidente. A linhagem HN30, por exemplo, apresentou aumento nos níveis das proteínas relacionadas à proliferação, pouquíssima apoptose, e mesmo assim as proteínas pró-apoptose analisadas mostraram-se elevadas. A partir daí um aumento na expressão destas proteínas pode ser induzido nas células, mas não seria suficiente para reverter os estímulos proliferativos, ou então serem posteriormente desativadas. HN6 e HN19 mostraram resultados semelhantes, com resposta proliferativa e sem tendência à apoptose. Estas linhagens apresentaram-se de modo mais coerente

quando comparadas a HN30. Nestes casos, a via do pAkt, ao ser estimulada age como esperado e bloqueia a via de sinalização pró-apoptótica. Chen et al. (1999) observaram que pAkt previne a ativação da caspase-3 pelo TGF β , e neste caso provavelmente também de Bad. O que não está demonstrado na literatura é a relação (direta ou indireta) entre os receptores TGF β R I e II e a via PI3K/Akt. Esta pode ser uma relação chave para a compreensão dos processos de sinalização envolvidos na progressão e disseminação do carcinoma epidermóide bucal. Em relação à linhagem HaCat, considerada como queratinócitos-controle, os resultados também apontam para uma falha no controle e correta execução do processo de apoptose. Além da heterogeneidade de sinalização própria do TGF β , pode-se levar em conta o fato de esta linhagem ser p53 mutante, com o fim de possibilitar sua sobrevivência em cultura. Desta maneira, o ciclo celular pode estar menos susceptível a estímulos apoptóticos.

Assim como verificado nas células tratadas com EGF, a imunofluorescência não revelou grandes alterações de localização das proteínas pAkt e Ciclina D1 frente ao tratamento com TGF β . Somente na HN31, em concordância com o que foi anteriormente exposto, pudemos notar grande perda da expressão nuclear das Ciclina D1 em várias áreas. Esta se mostrou rearranjada para o citoplasma, onde sofre degradação, podendo ser parte já do processo de morte celular.

Estes resultados, quando analisados em conjunto sugerem importantes aspectos para se analisar a natureza do carcinoma epidermóide. Primeiramente, a presença de receptores de EGF e seu conseqüente estímulo levam à progressão das células neoplásicas, iniciando-se com ativação de PI3K/Akt e tendo como um de seus efetores finais a Ciclina D1. Certamente a presença de mutações nestes genes também favorece a expansão tumoral. Quanto aos efeitos do TGF β , as dúvidas levantadas mostram-se tão numerosas quanto seus prováveis mecanismos de ação. Certo mesmo é seu papel duplo, de inibidor da proliferação celular, mas também de pró-oncogênico

(CHEN et al., 1998; CHEN et al., 1999; DERYNCK; ZHANG, 2003). Neste caso mostrou-se, na maioria das linhagens estudadas, que o efeito pró-sobrevivência sobrepõe-se àquele pró-morte, e que é mediado por pAkt. Este por sua vez, nem sempre exerce sua influência diretamente sobre os pró-apoptóticos, mas pode reprimi-los por outras vias. A interação direta entre os TGF β Rs e pAkt não pode ser descartada, porém ainda precisa ser esclarecida.

Em relação à terapêutica, a heterogeneidade genética presente em carcinoma epidermóides bucais reflete a necessidade de se visar alvos intracelulares que se situem no início do processo proliferativo, resultando em maior espectro de ação. Desta maneira, pAkt, por sua posição upstream nos eventos celulares é um forte candidato a ser alvo de terapias. Desta maneira, uma ação antagonista aos receptores de EGF, e ao estímulo de PTEN podem ser de grande valia nestes casos. Uma droga que vem se mostrando muito promissora é o trastuzumab, pois atua internalizando os receptores de EGF, e impedindo a ação dos fatores de crescimento (NAGATA et al., 2004). Isto faz com que PTEN seja desfosforilado e atue reprimindo a ativação de PI3K e conseqüentemente de Akt. Desta maneira, mesmo que a disponibilidade intracelular de Akt seja aumentada por força de uma mutação, por exemplo, pode-se prevenir que toda sua cascata de eventos seja desencadeada e a célula não sobreviva.

Por fim, vale ressaltar que mesmo em estudos clínicos já conduzidos com estas drogas, as reduções volumétricas das neoplasias ainda poderiam ser maiores (NAGATA et al., 2004; SLAMON et al., 2001). Isto decorre da já citada heterogeneidade de expressão gênica e protéica encontrada nestas neoplasias, além é claro do estadiamento clínico, fator aliado ao prognóstico. Conclui-se assim que continuam sendo o exame, prevenção e diagnóstico precoces os maiores aliados de uma terapia e de um prognóstico favorável nos pacientes portadores desta neoplasia, de curso clínico ainda infelizmente tão desfavorável.

7 CONCLUSÕES

7.1 O estímulo à proliferação celular em linhagens de carcinoma epidermóide bucal através do EGF atua através do aumento da expressão da proteína Akt. Esta age sobre o ciclo celular promovendo aumento dos níveis de Ciclina D1.

7.2 Estas linhagens de carcinoma epidermóide mostraram resposta heterogênea ao TGF β , confirmando seu caráter tanto pró-apoptótico quanto pró-oncogênico.

7.3 O desenvolvimento de terapias que visem o bloqueio de EGFR e o aumento na disponibilidade intracelular de PTEN pode se constituir em ferramenta valiosa no tratamento de grande parte dos carcinomas epidermóides.

REFERÊNCIAS¹

Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, Benavides F, Conti CJ, Sauk J, et al. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res* 2004;10:4029-37.

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

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

Araujo VC, Loyola AM, Pinto Junior DD, Borra RC, De Araujo NS. p53 In biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system. *Oral Oncol* 1997;33:5-9.

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

Bagutti C, Speight PM, Watt FM. Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Pathol* 1998;186(1):8-16.

Bartkova J, Falck J, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Lukas J, Bartek J. Chk2 tumour suppressor protein in human spermatogenesis and testicular germ-cell tumours. *Oncogene* 2001;20:5897-902.

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

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

---

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

Boring, CC; Squires, TS; Tong, T. Cancer statistics. Cancer statistics, 1992.
CA Cancer J Clin 1992 Jan-Feb;42(1):19-38. Erratum in: CA Cancer J Clin 1992;42:127-8.

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

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

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

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

Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massague J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. Cell 2002;110:19-32.

Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann Km, McCarthy J, et al. Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 2001;276:31858-62. Epub 2001 Jul 09.

Chen RH, Su YH, Chuang RL, Chang TY. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. Oncogene 1998;17:1959-68.

Chen RH, Chang MC, Su YH, Tsai YT, Kuo ML. Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. J Biol Chem 1999;274:23013-9.

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

Clark LC, Dalkin B, Krongrad A, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, et al Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol* 1998;81:730-4.

Coffer PJ, Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* 1991;201(2):475-81. Erratum in: *Eur J Biochem* 1992;205:1217.

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

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

Davies M, Paterson IC, Stone A, Huntley S, Patel V, Curtis R, et al. Loss of differentiation of 4NQO-induced rat malignant oral keratinocytes correlates with metastatic dissemination and is associated with a reduced cellular response to TGF-beta1 and an altered receptor profile. *J Oral Pathol Med* 1999;28:397-405.

Del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997;278:687-9.

Derynck R. TGF-beta-receptor-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 1994;19:548-53.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003;425:577-84.

Dijkers Pf, Medema Rh, Pals C, Banerji L, Thomas Ns, Lam Ew, et al. Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 2000;20:9138-48.

Doki Y, Imoto M, Han EK, Sgambato A, Weinstein IB. Increased expression of the P27KIP1 protein in human esophageal cancer cell lines that over-express cyclin D1. *Carcinogenesis* 1997;18:1139-48

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

Fantl V, Stamp G, Andrews A, Rosewell I, Dickson C. Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev* 1995;9:2364-72.

Ferguson Km, Kavran Jm, Sankaran Vg, Fournier E, Isakoff Sj, Skolnik Ey, et al. Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Mol Cell* 2000;6:373-84.

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;20:5712-21.

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;30:193-204.

Ghose A, Fleming J, El-Bayoumy K, Harrison PR. Enhanced sensitivity of human oral carcinomas to induction of apoptosis by selenium compounds: involvement of mitogen-activated protein kinase and Fas pathways. *Cancer Res* 2001;61:7479-87.

Gille H, Downward J. Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J Biol Chem* 1999;274:22033-40.

Grandis JR, Tweardy DJ. TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer. *J Cell Biochem Suppl* 1993;17F:188-91.

Grandis JR, Chakraborty A, Zeng Q, Melhem MF, Tweardy DJ. Downmodulation of TGF-alpha protein expression with antisense oligonucleotides inhibits proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *J Cell Biochem* 1998;69:55-62.

Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, et al. Normalization of EGFR mRNA levels following restoration of wild-type p53 in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int J Oncol* 1998;13:375-8.

Gupta AK, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Cheng Y, Bernhard EJ, Muschel RJ, et al. The Ras radiation resistance pathway. *Cancer Res* 2001;61:4278-82.

Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, Feldman MD, Goldsmith JD, Mick R, Machtay M, Rosenthal DI, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, Bernhard EJ, Weber RS, Muschel RJ. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin Cancer Res* 2002;8:885-92.

Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:255-68.

Han EK, Begemann M, Sgambato A, Soh JW, Doki Y, Xing WQ, et al. Increased expression of cyclin D1 in a murine mammary epithelial cell line induces p27kip1, inhibits growth, and enhances apoptosis. *Cell Growth Differ* 1996;7:699-710

Han EK, Ng SC, Arber N, Begemann M, Weinstein IB. Roles of cyclin D1 and related genes in growth inhibition, senescence and apoptosis. *Apoptosis* 1999;4:213-9

Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, Trevor KT, Seftor RE. Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15:507-25.

Herbst RS, Hong WK. IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for treatment of head and neck cancer. *Semin Oncol.* 2002 (5 Suppl 14):18-30.

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

Huang SM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Invest New Drugs* 1999;17:259-69.

Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell* 2002;10:283-94.

Islam S, Carey TE, Wolf GT, Wheelock MJ, Johnson KR. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1996;135(6 Pt 1):1643-54.

Islam S, Kim JB, Trendel J, Wheelock MJ, Johnson KR. Vimentin expression in human squamous carcinoma cells: relationship with phenotypic changes and cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biochem* 2000;78:141-50.

Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000;267:6954-67.

Janmaat ML, Giaccone G. The epidermal growth factor receptor pathway and its inhibition as anticancer therapy. *Drugs Today (Barc)* 2003;39 Suppl C:61-80.

Jefferies S, Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2001;37:115-26.

Jelinek T, Dent P, Sturgill TW, Weber MJ. Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1996;16:1027-34. Erratum in: *Mol Cell Biol* 1997 May;17(5):2971.

Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, Goldstein NI, Fisher PB. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene* 1995;11:2477-86.

Jones PF, Jakubowicz T, Hemmings BA. Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul* 1991;2:1001-9.

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

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

Kim YS, Yi Y, Choi SG, Kim SJ. Development of TGF-beta resistance during malignant progression. *Arch Pharm Res* 1999;22:1-8.

Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133-46.

Kotelevets L, van Hengel J, Bruyneel E, Mareel M, van Roy F, Chastre E. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for stabilizing intercellular junctions and reverting invasiveness. *J Cell Biol* 2001;155:1129-35.

Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res* 2004;10:5455-63.

Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, Anderson WP, Speight PM, Marshall JF, et al. Tumour-derived TGF-beta1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *Br J Cancer* 2004;90:822-32.

Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 2001;61:3819-25.

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

Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK, et al. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:3302-6.

Lo Muzio L, Pannone G, Mignogna MD, Staibano S, Mariggio MA, Rubini C, et al. P-cadherin expression predicts clinical outcome in oral squamous cell carcinomas. *Histol Histopathol* 2004;19:1089-99.

Logullo AF, Nonogaki S, Miguel RE, Kowalski LP, Nishimoto IN, Pasini FS, et al. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. *J Oral Pathol Med* 2003;32:139-45.

Lorch JH, Klessner J, Park JK, Getsios S, Wu YL, Stack MS, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition promotes desmosome assembly and strengthens intercellular adhesion in squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004;279:37191-200.

Luk SC, Siu SW, Lai CK, Wu YJ, Pang SF. Cell cycle arrest by a natural product via G2/M checkpoint. *Int J Med Sci* 2005;2:64-9.

Ma BB, Bristow RG, Kim J, Siu LL. Combined-modality treatment of solid tumors using radiotherapy and molecular targeted agents. *J Clin Oncol* 2003;21:2760-76.

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

Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:222-31

Massague J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:169-78.

Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, van 't Hof-Grootenboer B, de Mulder PH, et al. E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 1993;55:580-5.

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

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

Mendez E, Cheng C, Farwell DG, Ricks S, Agoff SN, Futran ND, et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2002;95:1482-94.

Mhashilkar AM, Schrock RD, Hindi M, Liao J, Sieger K, Kourouma F, et al. Melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7): a novel anti-tumor gene for cancer gene therapy. *Mol Med* 2001;7(4):271-82.

Mhashilkar AM, Stewart AL, Sieger K, Yang HY, Khimani AH, Ito I, et al. MDA-7 negatively regulates the beta-catenin and PI3K signaling pathways in breast and lung tumor cells. *Mol Ther* 2003;8:207-19.

Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001;114:4359-69.

Muise-Helmericks RC, Grimes HI, Bellacosa A, Malstrom SE, Tsichlis PN, Rosen N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* 1998;273:29864-72.

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

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

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

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Oral & Maxillofacial Pathology*. Philadelphia: WB Saunders; 1995.

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

Niinaka Y, Haga A, Negishi A, Yoshimasu H, Raz A, Amagasa T. Regulation of cell motility via high and low affinity autocrine motility factor (AMF) receptor in human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 2002;38:49-55.

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.

Oda H, Tsukita S, Takeichi M. Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol* 1998;203:435-50.

Pagano M, Theodoras AM, Tam SW, Draetta GF. Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes Dev* 1994;8:1627-39

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

Patel V, Senderowicz AM, Pinto D Jr, Igishi T, Raffeld M, Quintanilla-Martinez L, et al. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis. *J Clin Invest* 1998;102:1674-81.

Paterson IC, Matthews JB, Huntley S, Robinson CM, Fahey M, Parkinson EK, et al. Decreased expression of TGF-beta cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2001;193:458-67.

Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D, et al. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem* 2001;276:27462-9.

Petty WJ, Dragnev KH, Dmitrovsky E. Cyclin D1 as a target for chemoprevention. *Lung Cancer* 2003;41 Suppl 1:S155-61

Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 2000;14(15):1837-51.

Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, et al. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 1994;54:2419-23.

Rubin Grandis J, Chakraborty A, Melhem MF, Zeng Q, Tweardy DJ. Inhibition of epidermal growth factor receptor gene expression and function decreases proliferation of head and neck squamous carcinoma but not normal mucosal epithelial cells. *Oncogene* 1997;15:409-16.

Price BD, Youmell MB. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitizes murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage. *Cancer Res* 1996;56:246-50.

Prime SS, Eveson JW, Stone AM, Huntley SP, Davies M, Paterson IC, et al. Metastatic dissemination of human malignant oral keratinocyte cell lines following orthotopic transplantation reflects response to TGF-beta 1. *J Pathol* 2004;203:927-32.

Renshaw MW, Ren XD, Schwartz MA. Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *EMBO J* 1997;16:5592-9.

Riesterer O, Tenzer A, Zingg D, Hofstetter B, Vuong V, Pruschy M, et al. Novel radiosensitizers for locally advanced epithelial tumors: inhibition of the PI3K/Akt survival pathway in tumor cells and in tumor-associated endothelial cells as a novel treatment strategy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:361-8.

Saeki T, Mhashikar A, Chada S, Branch C, Roth JA, Ramesh R. Tumor-suppressive effects by adenovirus-mediated mda-7 gene transfer in non-small cell lung cancer cell in vitro. *Gene Ther* 2000;7:2051-7.

Saeki T, Mhashikar A, Swanson X, Zou-Yang XH, Sieger K, Kawabe S, et al. Inhibition of human lung cancer growth following adenovirus-mediated mda-7 gene expression in vivo. *Oncogene* 2002;21:4558-66.

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

Sawa H, Ohshima TA, Ukita H, Murakami H, Chiba Y, Kamada H, et al. Alternatively spliced forms of cyclin D1 modulate entry into the cell cycle in an inverse manner. *Oncogene* 1998;16:1701-12

Shi Y, Gera J, Hu L, Hsu JH, Bookstein R, Li W, et al. Enhanced sensitivity of multiple myeloma cells containing PTEN mutations to CCI-779. *Cancer Res* 2002;62:5027-34.

Shimizu T, Izumi H, Oga A, Furumoto H, Murakami T, Ofuji R, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression and genetic aberrations in metastatic squamous-cell carcinoma of the skin. *Dermatology* 2001;202:203-6.

Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 1995;82:621-30.

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

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

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.

Spencer KS, Graus-Porta D, Leng J, Hynes NE, Klemke RL. ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol* 2000;148:385-97.

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

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

Stacey DW. Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:158-63

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991;251:1451-5.

Taki M, Kamata N, Yokoyama K, Fujimoto R, Tsutsumi S, Nagayama M. Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Cancer Sci* 2003;94:593-7.

Takuwa N, Fukui Y, Takuwa Y. Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999;19:1346-58.

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

Thant AA, Nawa A, Kikkawa F, Ichigotani Y, Zhang Y, Sein TT, et al. Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2000;18(5):423-8.

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

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

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328:184-94.

Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:22-9.

Weng LP, Brown JL, Baker KM, Ostrowski MC, Eng C. PTEN blocks insulin-mediated ETS-2 phosphorylation through MAP kinase, independently of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Hum Mol Genet* 2002;11:1687-96. Erratum in: *Hum Mol Genet* 2003 Aug 1;12(15):1943.

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

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

Wuerzberger-Davis SM, Chang PY, Berchtold C, Miyamoto S. Enhanced G2-M arrest by nuclear factor- κ B-dependent p21waf1/cip1 induction. *Mol Cancer Res* 2005;3:345-53.

Wünsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002;38:737-46

Yamaguchi H, Wang HG. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 2001;20:7779-86.

Yigitbasi OG, Younes MN, Doan D, Jasser SA, Schiff BA, Bucana CD, et al. Tumor cell and endothelial cell therapy of oral cancer by dual tyrosine kinase receptor blockade. *Cancer Res* 2004; 64:7977-84.

Yu L, Hebert MC, Zhang YE. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J* 2002;21:3749-59.

Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol* 2000;151:483-94.

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

Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Klos KS, Lan KH, Yang Y, et al. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res* 2004;10:6779-88.