MARINA DE DEUS MOURA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MDM2, P53, P21^{WAF1}
E pAKT EM CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO E
ADENOCARCINOMA NÃO-ESPECÍFICO
DE GLÂNDULAS SALIVARES**

São Paulo
2006

Marina de Deus Moura de Lima

**Avaliação da expressão das proteínas Mdm2, P53, P21^{waf1} e pAkt
em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma não- específico
de glândulas salivares**

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Mantesso

São Paulo
2006

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Lima, Marina de Deus Moura de

Avaliação da expressão das proteínas Mdm2, P53, P21^{waf1} e pAkt em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma não-específico de glândulas salivares / Marina de Deus Moura de Lima; orientador Andrea Mantesso. -- São Paulo, 2006.

94p.: tab., fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Carcinoma adenóide cístico – Proteínas – Avaliação 2. Adenocarcinoma – Proteínas – Avaliação 3. Patologia bucal

CDD 617.63
BLACK D61

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lima MDM. Avaliação da expressão das proteínas MDM2, P53, P21^{WAF1} e pAKT em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma não-específico de glândulas salivares [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

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: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu marido **Carlos Eduardo**, por todo o amor, companheirismo, apoio e participação ativa na elaboração desta dissertação;

Aos meus pais, **Wagner e Lúcia**, brilhantes professores, por me ensinarem o valor do estudo, pela oportunidade de chegar até aqui, pelo apoio e confiança. Vocês são grandes exemplos e motivo de orgulho;

Aos meus irmãos, **Rafael e Isabela**, sempre presentes em minha vida, pela amizade que sempre partilhamos;

À minha querida avó **Gerusa** (*in memoriam*) por ser uma luz que me acompanha e me fortalece. Onde quer que esteja, com certeza, está feliz por me ver chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora doutora **Andrea Mantesso** pela disponibilidade irrestrita e orientação segura, crítica e criativa. O meu reconhecimento e gratidão, inclusive pela amizade demonstrada;

À **Dra. Vera Cavalcanti de Araújo**, exemplo de vida, de profissionalismo e de amor à ciência; um ícone da patologia bucal, pelo imprescindível apoio e orientação na elaboração desta dissertação;

Ao professor doutor **Ney Soares de Araújo**, pela experiência e empenho com que sempre conduziu este curso de pós-graduação e pela valiosa colaboração que continua oferecendo;

À professora doutora **Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa** pelo conhecimento transmitido, pela competência e generosidade demonstradas. Obrigada por ter me acolhido e pela valiosa colaboração na concretização deste trabalho. Minha sincera admiração!

Ao professor doutor **Décio dos Santos Pinto Júnior**, obrigada por ter contribuído de forma bastante ativa no desenvolvimento deste trabalho com total disponibilidade e pela segurança transmitida;

Aos professores doutores da disciplina de Patologia Bucal da USP: **Marina Magalhães, Marília Martins, Fábio Nunes, Karem Ortega**, cujos ensinamentos foram fundamentais para a minha formação;

Ao professor doutor **Ruy Jagger** pela valiosa orientação na obtenção dos resultados do western blotting;

Ao professor doutor **Fernando Soares**, por ter aberto as portas do Hospital do Câncer, cedendo casos para completar a casuística e pelo auxílio na finalização das reações imunoistoquímicas;

À minha grande amiga **Yonara Maria Freire Soares Marques**, que esteve sempre ao meu lado, enfrentando todas as dificuldades no decorrer deste curso. Sua fonte inesgotável de otimismo foi a energia que nos levou a atingir os nossos objetivos. Você é uma pessoa iluminada e muito especial e a nossa convivência me trouxe muitos ensinamentos de vida. Obrigada pelo companheirismo, dedicação e amizade;

Ao grande amigo **Sérgio de Melo Alves Júnior** por todos os ensinamentos transmitidos, pela ajuda nas técnicas e na interpretação dos resultados e, principalmente, por sua amizade. Obrigada por ter me ensinado o bê-a-bá do laboratório de cultura de células e pelo estímulo constante durante esse período;

À amiga e competente profissional **Vanessa Freitas** pela atenção e grande ajuda na otimização do western blotting e imunofluorescência;

À **Cristiane Furuse** pela disponibilização do laboratório da Faculdade São Leopoldo Mandic para algumas reações e captura das imagens;

À **Kívia Ferrazzo**, por ter se tornado uma grande amiga! Seus conselhos de vida foram muito valiosos... Agradeço também as muitas aulas de photoshop!

Às minhas amigas **Fernanda Yamamoto, Flávia Calo e Aluana Dal Vecchio**. Vocês fizeram parte desta vitória!

A todos os **colegas do curso de Pós-Graduação** que, compartilhando experiências e informações, foram de grande importância durante todo o curso.

Às amigas **Elisa Santos e Edna Toddai (*in memoriam*)**, sem as quais seria impossível conquistar o alto padrão de qualidade no processamento do material e com as quais vivi momentos de agradável, sincero e produtivo convívio;

Agradeço de coração à atenção sempre prestada pelas funcionárias **Zilda, Néia, Bia, Nair e Patrícia**;

À Biblioteca da FOU SP, em especial, **Glauci e Águia**, pela valiosa e fundamental contribuição na confecção final desta tese;

À **CAPES** pelo auxílio financeiro através da bolsa de mestrado;

Quando mencionamos nomes, incorremos no risco de esquecer alguém e, por isso, quero agradecer **a todos** que, embora não tenham sido mencionados, estiveram presentes comigo durante este percurso.

Lima MDM. Avaliação da expressão das proteínas MDM2, P53, P21^{WAF1} e pAKT em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma não-específico de glândulas salivares [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

As proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT estão entre as muitas já identificadas que visam, por meio do equilíbrio direto e indireto entre si, manter o balanço entre morte e proliferação celular. Existe um leque aberto de hipóteses sobre a via de atuação dessas proteínas na tumorigênese de glândulas salivares, porém não há dados conclusivos. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão das proteínas MDM2, P53, P21 e pAkt em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma não-específico de glândula salivar, através das técnicas de imunoistoquímica, em casos fixados em parafina; e imunofluorescência e western-blotting, em linhagens celulares provenientes dessas lesões. Os estudos imunoistoquímicos mostraram expressão de MDM2 e pAKT na maioria dos carcinomas adenóides císticos (CAC) avaliados e nos 3 casos de adenocarcinoma não-específicos (ANE). As linhagens Cac2 (proveniente de carcinoma adenóide cístico) e HSG (derivada de adenocarcinoma não-específico) também exibiram expressão das proteínas MDM2 e pAKT tanto no núcleo quanto no citoplasma celular. A proteína P53 mostrou expressão variável entre os diferentes CAC analisados e os 3 casos de ANE estudados mostraram marcação positiva para a proteína P53. Com relação às linhagens celulares, a Cac2 não expressou a proteína P53, enquanto a HSG apresentou expressão nuclear e citoplasmática dessa proteína. As glândulas salivares normais não exibiram marcação imunoistoquímica para as proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT. Os

resultados deste estudo sugerem que as proteínas pAKT e MDM2 estão envolvidas na tumorigênese e/ou progressão tumoral de carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma não específico.

Palavras-Chave: MDM2; P53; P21; pAKT; carcinoma adenóide cístico; adenocarcinoma não específico

Lima MDM. Evaluation of expression of MDM2, P53, P21^{WAF1} e pAKT in adenoid cystic carcinoma and adenocarcinoma not otherwise specified of salivary glands [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

MDM2, P53, P21 and pAKT are proteins co-related to the balance between cell death and survival. There are many hypothesis on the role of these proteins in salivary gland tumorigenesis, however, no conclusive data have been published. The aim of this study was to evaluate the expression of MDM2, P53, P21 and pAKT proteins on adenoid cystic carcinomas (ACC) and adenocarcinoma not otherwise specified (ANOS) through immunohistochemistry, immunofluorescence and western-blotting techniques. The immunostaining studies showed MDM2 and pAKT expression in most cases of adenoid cystic carcinoma and in all adenocarcinoma not-otherwise specified. The cell lines CAC2 (derived from adenoid cystic carcinoma) and HSG (derived from adenocarcinoma not otherwise specified) also showed nuclear and cytoplasmic expression of MDM2 and pAKT. The expression of P53 was variable in the different ACCs analyzed and was absent on CAC2 cells. However, P53 was strongly positive in all ANOS, and HSG cells also showed nuclear and cytoplasmic staining. No MDM2, P53, P21 and pAKT expression was found in normal salivary glands. Therefore, MDM2 and pAKT may participate in the tumorigenesis and/or progression of adenoid cystic carcinoma and adenocarcinoma not otherwise specified.

Keywords: MDM2; P53; P21, pAKT; adenoid cystic carcinoma; adenocarcinoma not otherwise specified

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1- Carcinoma adenóide cístico: HE e expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, pAKT e P21.....	66
Figura 5.2- Adenocarcinoma não específico: HE e expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, pAKT e P21	67
Figura 5.3- Representação gráfica da média de valores da quantificação das proteínas P53, Mdm2, P21, pAkt e seus respectivos controles de acordo com o número de pixels lidos.....	70
Figura 5.4- Resultados quantitativos em western blotting relativos à expressão das proteínas MDM2, P53, P21, pAKT e β -actina nas linhagens Cac2, HSG e controles.....	70
Figura 5.5- Expressão das proteínas MDM2 e pAKT na linhagem Cac2.....	72
Figura 5.6- Expressão das proteínas P53, MDM2 e pAKT na linhagem HSG.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Tipo, concentração, procedência, clone e tempo de incubação dos anticorpos utilizados na imunoistoquímica	50
Tabela 4.2- Relação das linhagens de neoplasias de glândula salivar que foram utilizadas no estudo com sua respectiva origem.....	52
Tabela 4.3- Tipo, concentrações, clones, procedência e tempo de incubação dos anticorpos utilizados na Imunofluorescência	54
Tabela 4.4- Composição do Gel de acrilamida 10% com SDS (10X16 cm).....	57
Tabela 4.5- Relação dos anticorpos que foram utilizados no Western Blotting.....	59
Tabela 5.1- Dados referentes ao tipo do tumor, localização, porcentagem da expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT nos casos de carcinoma adenóide cístico, adenocarcinoma não-específico e glândula salivar normal	63
Tabela 5.2- Análise comparativa da expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT entre carcinomas adenóides císticos e glândulas salivares normais.....	64
Tabela 5.3- Análise comparativa da expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT entre adenocarcinomas não-específicos e glândulas salivares normais	65
Tabela 5.4 - Análise comparativa da expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT entre carcinomas adenóides císticos sólidos e cribriformes.....	65
Tabela 5.5 - Expressão e localização celular das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT nas linhagens Cac 2 e HSG.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	gene humano homólogo ao oncogene viral v-akt, causador de leucemia em ratos. Sinônimo de PKB.
pAKT	proteína fosforilada Akt
BSA	albumina de soro bovino
CAC	carcinoma adenóide cístico
CDKs	quinases dependentes de ciclina (cyclin-dependent kinases)
Cip1	“CDK-interacting protein 1”
CO ₂	dióxido de carbono
DAB	3,3-diaminbenzidina
DME	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
EDTA	“Ethylenediamine tetraacetic acid”
et al.	e colaboradores
G1	intervalo entre a mitose e a síntese de DNA
HE	hematoxilina e eosina
HN31	linhagem celular metastática de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
Hacat	linhagem celular derivada de queratinócitos com mutação no gene p53
kDa	quilodaltons
mdm2	gene mdm2
MDM2	MDM2 (murine double minute type 2 gene)
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
ml	mililitro
m ²	metro quadrado

mM	mili-molar
µm	micrômetro
µg	micrograma
PCR	reação em cadeia da polimerase
p21	gene p21
P21	proteína inibidora do ciclo celular de 21 kDa
p53	gene p53
P53	fosfoproteína nuclear de 53 kDa
PBS	tampão fosfato-saliva (phosphate-buffered saline)
PI3k	fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
S	período de síntese do DNA
SDS	sulfato dodecil sódico
Ser	serina
TA	temperatura ambiente
TBST	“Tris-buffered saline tween 20”
TRIS	“Tris-hydroximetil-aminometano”
TEMED	tetrametiletilenodiamino
USA	“United States of América”

LISTA DE SÍMBOLOS

% por cento

°C graus Celsius

β beta – segunda letra do alfabeto grego

μm micrômetro

x vezes

- menos

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Neoplasias malignas de glândulas salivares	18
2.1.1 Carcinoma adenóide cístico.....	19
2.1.2 Adenocarcinoma não-específico.....	22
2.2 MDM2, P53, P21 ^{WAF1} e pAKT – Definições e funções básicas.....	23
2.3 MDM2, P53, P21 ^{WAF1} e pAKT – Interação e expressão em neoplasias	30
2.4 MDM2, P53, P21 ^{WAF1} e pAKT – Interação e expressão em neoplasias de glândula salivar.....	37
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Casuística e análise morfológica.....	48
4.2 Técnica imunoistoquímica.....	49
4.3 Cultivo Celular.....	52
4.4 Imunofluorescência.....	54
4.5 Western Blotting	56
5 RESULTADOS	61
5.1 Imunoistoquímica	61
5.2 Western Blotting	68
5.3 Imunofluorescência.....	71
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS	94

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias de glândula salivar correspondem a 3% dos tumores que acometem a cabeça e o pescoço e constituem uma área de importância na patologia bucal e maxilofacial. A ampla variedade de comportamentos biológicos e tipos histológicos que esses tumores apresentam tornam difícil seu diagnóstico e tratamento, suscitando uma constante busca por informações que desvendem os aspectos moleculares envolvidos na sua tumorigênese.

O gene p53, um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 17, é o gene alterado com maior frequência nos cânceres humanos e é responsável, frente a algum dano no DNA, por segurar o ciclo celular na fase G1 para levar as células à reparação ou à apoptose, evitando que mutações sejam passadas adiante. Vários fatores podem levar à inibição da função do p53, como: mutação do gene, alteração na sub-localização celular da proteína P53, ação de vírus oncogênicos, assim como interação entre proteínas.

Dentre os proto-oncogenes envolvidos no controle do p53 está o mdm2 (murine double minute 2) que, em condições de amplificação ou superexpressão, é capaz de inativar as funções do gene p53, pois a proteína MDM2 forma um complexo com a P53, transportando-a ao citoplasma onde esta última sofre degradação.

A proteína pAKT atua indiretamente na via do p53, pois se liga à MDM2, fosforilando-a e permitindo que a MDM2 se desloque do citoplasma para o núcleo, onde é requerida para se ligar à P53. Essa proteína, portanto, é facilitadora de tumorigênese e antagonista da P53.

O p21, um gene ativado pelo p53, é o principal mediador da parada do ciclo celular. Sua proteína age como inibidora universal das quinases dependentes de ciclina regulando, portanto, a entrada das células na fase S. Além disso, a proteína P21 é capaz de inibir a replicação do DNA interagindo com o PCNA para facilitar processos de reparo e pode apresentar um papel importante na senescência celular e diferenciação terminal.

Dessa forma, as proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT estão entre as muitas já identificadas que visam, por meio do equilíbrio direto e indireto entre si, manter o balanço entre morte e proliferação celular. Portanto, eventuais falhas ou desvios nesta engrenagem intrincada e complexa, podem contribuir para o desenvolvimento de tumores, ou mesmo para um comportamento mais agressivo dos mesmos.

Existe um leque aberto de hipóteses sobre a via de atuação dessas proteínas na tumorigênese de glândulas salivares, porém não há dados conclusivos. Dessa forma, nos propusemos a analisar a expressão das proteínas MDM2, P53, P21 e pAkt através das técnicas de imunoistoquímica, imunofluorescência e western-blotting em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma não-específico de glândulas salivares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para uma melhor compreensão, a revisão da literatura foi dividida em quatro tópicos:

- Neoplasias Malignas de Glândulas Salivares;
- MDM2, P53, P21^{WAF1} e pAKT – Definições e funções básicas;
- MDM2, P53, P21^{WAF1} e pAKT – Interação e expressão em neoplasias;
- MDM2, P53, P21^{WAF1} e pAKT – Interação e expressão em neoplasias de glândula salivar

2.1 Neoplasias malignas de glândulas salivares

As neoplasias malignas de glândula salivar são lesões raras, sendo que sua frequência anual varia de 0,4 a 2,6 casos por 100.000 habitantes nos Estados Unidos (BARNES et al., 2005). No Brasil, esses tumores representam 38% dos tumores de glândulas salivares (LOYOLA et al., 1995). Essas lesões constituem uma área importante na patologia bucal e maxilofacial devido à dificuldade de diagnóstico e ao alto índice de metástases associado a algumas dessas lesões.

Nessa revisão serão apresentados o carcinoma adenóide cístico e o adenocarcinoma não-específico, já que eles são os objetos de estudo desse trabalho.

2.1.1 Carcinoma adenóide cístico

Dentre os tumores malignos das glândulas salivares, o carcinoma adenóide cístico (CAC) é um dos mais comuns e mais bem reconhecidos. Ele corresponde a aproximadamente 10% das neoplasias de glândula e envolve mais freqüentemente as glândulas parótida, submandibular e glândulas salivares menores. O CAC acomete pacientes de todas as idades, porém é predominante em adultos com um pico de incidência entre a quinta e a sexta décadas de vida. O tumor não exhibe predileção por sexo, exceto os de glândulas submandibulares, que acometem mais frequentemente pacientes do sexo feminino (BARNES et al., 2005; LOYOLA et al., 1995).

Em relação acometimento de glândulas salivares menores, o CAC corresponde também à segunda neoplasia maligna mais comum, representando 35% das neoplasias malignas de glândulas e 13% de todos os tumores de glândulas salivares (LOYOLA et al., 1995).

Não existem características clínicas específicas capazes de determinar o diagnóstico do carcinoma adenóide cístico, sendo o sinal mais comumente relatado um crescimento lento seguido por dor, já que esse tumor apresenta tendência a causar invasão perineural (QURESHI et al., 2005). Paralisia do nervo facial também pode ocorrer (BARNES et al., 2005).

Macroscopicamente, os CAC são sólidos, bem circunscritos, mas não apresentam cápsula. São invariavelmente infiltrativos (BARNES et al., 2005).

Histologicamente o carcinoma adenóide cístico é composto por uma mistura de células epiteliais e células mioepiteliais que se organizam em diferentes padrões

morfológicos, sendo classificados como cribriforme, tubular e sólido. Usualmente ocorre uma combinação destes padrões e o tumor é classificado com base no padrão predominante. O subtipo mais freqüente é o cribriforme que é caracterizado por ninhos de células com espaços microcísticos cilíndricos que são preenchidos com material mucóide hialino ou basofílico. No padrão tubular, ductos bem formados e túbulos com lúmen central são circundados por uma dupla camada de células (células epiteliais internamente e mioepiteliais externamente). Já o tipo sólido, ou basalóide, é formado por lençóis de células tumorais uniformes que demonstram pouca tendência para a formação de ductos ou cistos. Nas variantes cribriforme e sólida, pequenos ductos verdadeiros estão invariavelmente presentes, mas podem ser difíceis de serem identificados. O estroma dentro do tumor é geralmente hialinizado e pode manifestar características mixóides. Em alguns tumores, existe um extenso estroma hialino com atenuação do componente epitelial (BARNES et al., 2005).

Um achado altamente característico do carcinoma adenóide cístico é a tendência à invasão perineural. Além disso, o CAC pode invadir osso extensivamente, mesmo antes de evidência radiográfica de destruição óssea (BARNES et al., 2005).

Com relação ao diagnóstico diferencial, as entidades mais importantes a serem diferenciadas do carcinoma adenóide cístico são: o adenoma pleomórfico, o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, o carcinoma epitelial-mioepitelial, o adenoma de células basais e o adenocarcinoma de células basais (BARNES et al., 2005).

A imunoistoquímica tem sido utilizada para confirmação do diagnóstico dessa lesão, sendo que as células lumbais do CAC exibem expressão positiva das

citoqueratinas CK7, CK8 e CK19, expressão variável da proteína CK14 e ausência de expressão das proteínas CK13, vimentina e actina de músculo liso. Ao mesmo tempo, suas células não-luminais apresentam expressão de vimentina, variável expressão de actina de músculo liso e ausência de marcação para as citoqueratinas (ARAÚJO et al., 2000b).

O tratamento do CAC, sempre que possível, deve ser a ressecção cirúrgica de toda a lesão. A radioterapia pós-cirúrgica parece estar indicada por aumentar o controle local da neoplasia e o intervalo em que o paciente se apresenta livre da doença (BARNES et al., 2005; SUR et al., 1997; TRIANTAFFILIDOU et al., 2006).

Os fatores que influenciam a taxa de sobrevida incluem padrão histológico, local de acometimento do tumor, estágio clínico, envolvimento ósseo e condições das margens cirúrgicas. Geralmente, os tumores compostos pelos padrões tubular e cribriforme apresentam um curso clínico menos agressivo que aqueles que apresentam mais de 30% de componente sólido. O tipo sólido tem o pior prognóstico, sendo caracterizado por inúmeras recorrências em pouco tempo, metástases precoces e alta mortalidade. A taxa de sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 35% e a sobrevida longa é pobre, sendo que de 80 a 90% dos pacientes morrem da doença em 10 a 15 anos. O envolvimento de linfonodos é incomum, porém, quando ocorre, geralmente é originado de tumores da glândula submandibular devido a invasão contígua e não à metástase. A incidência de metástase a distância é estimada variar de 25 a 55% e acomete preferencialmente osso, cérebro e fígado. (BARNES et al., 2005; TRIANTAFFILIDOU et al., 2006).

2.1.2 Adenocarcinoma não-específico

O adenocarcinoma não-específico (ANE) é um tumor maligno de glândulas salivares que exibe diferenciação ductal, mas que não apresenta características histológicas que o classifiquem como qualquer outro tipo de carcinoma salivar (BARNES et al., 2005).

Como os referidos adenocarcinomas representam um grupo diverso de neoplasmas, é difícil generalizar sobre seus aspectos clínicos e microscópicos. Esses tumores representam 17% dos carcinomas salivares e acometem preferencialmente indivíduos na sexta década de vida e do sexo feminino (BARNES et al., 2005). Quando levado em conta apenas tumores de glândulas salivares menores, esses tumores representam 1% de todos os tumores de glândulas salivares e 2% das neoplasias malignas de glândulas salivares menores (LOYOLA et al., 1995).

Segundo Ellis e Auclair (1996), os adenocarcinomas não-específicos correspondem à segunda neoplasia maligna originada de glândula salivar mais comum, correspondendo a 17% desses carcinomas.

A lesão aparece como uma massa solitária e, geralmente, assintomática. Porém, dor pode estar presente em 20% dos casos, comumente associada com tumores da glândula submandibular. Tumores originados de glândula menor podem aparecer ulcerados (BARNES et al., 2005; NEELY; ROHRER; YOUNG, 1996).

Macroscopicamente, o ANE é geralmente parcialmente circunscrito, mas em muitas áreas a periferia é irregular e mal definida. Áreas de necrose ou hemorragia podem contrastar com a superfície branca ou amarelada (BARNES et al., 2005).

Histologicamente observam-se a presença de estruturas glandulares ou semelhantes a ductos, crescimento infiltrativo para o parênquima ou tecidos adjacentes e ausência de características de qualquer outro adenocarcinoma salivar. Existe uma variabilidade considerável na sua estrutura. Alguns apresentam ninhos ou cordões de células tumorais, outras ilhas discretas largas entremeadas por tecido conjuntivo fibroso e outros lençóis densamente celularizados. Células cuboidais ou ovóides predominam na maioria dos tumores, no entanto, células claras podem se espalhar na lesão. Além disso, pequenos depósitos de material acelular eosinofílico e mucina extracelular podem estar presentes. A variabilidade citológica é útil para se graduar esse tumor, que pode ser classificado histologicamente em baixo, médio ou alto grau de malignidade (BARNES et al., 2005; NEELY; ROHRER; YOUNG, 1996).

Os dados limitados acerca dessa lesão sugerem que o estágio clínico, local de envolvimento e grau influenciam o prognóstico. Tumores de glândulas menores têm um melhor prognóstico que os de glândulas maiores. Além disso, metástases à distância podem ocorrer e recorrência é mais freqüentemente relacionada a tumores de alto grau de malignidade (BARNES et al., 2005).

2.2 MDM2, P53, P21^{WAF1} e pAKT – Definições e funções básicas

O gene p53 ocupa um lugar de destaque dentro do grupo dos genes supressores de tumor. Atualmente, constitui o principal gene relacionado ao câncer e seu estudo se tornou um dos campos mais ativos e promissores na pesquisa sobre essa doença. Isto se deve, em grande parte, ao fato de que alterações tanto no

gene, como na respectiva proteína, representam os achados mais freqüentes até hoje identificados nos cânceres em humanos (VOUSDEN; LU, 2002).

O gene p53 se localiza no braço curto do cromossomo humano 17p13.1 e codifica uma fosfoproteína nuclear cuja função primordial é prevenir a propagação de células geneticamente danificadas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999). Sendo assim, em condições de normalidade, seus níveis celulares são baixos devido à sua meia-vida curta (cerca de 20 minutos). Contudo, mediante sinais de estresse tanto intracelulares, como extracelulares encontrados durante o desenvolvimento e progressão de tumores, a proteína P53 que se encontrava em estado latente é ativada por meio da fosforilação e acetilação de resíduos específicos da sua molécula. Disso resulta uma rápida estabilização e aumento em seus níveis, assim como seu transporte para o núcleo. Essa proteína acumulada se liga ao DNA e estimula a transcrição de vários genes que mediam os dois efeitos principais do gene p53: a interrupção do ciclo celular e a apoptose (MICHAEL; OREN, 2002; NYLANDER; DABELSTEEN; HALL, 2000).

A proteína P53 consiste de 393 aminoácidos (aa) e contém três principais domínios funcionais. Na porção N-terminal está o domínio de ativação transcricional (aa 1-42) e na parte central está o domínio de ligação a seqüências específicas do DNA (aa 102-292). A porção C-terminal contém um domínio de oligomerização (aa 323-356) e um domínio de regulação (aa 360-393) (MAY; MAY, 1999).

Essa proteína está envolvida em diferentes aspectos da parada do ciclo celular, apoptose, controle da integridade do genoma e reparo do DNA. A P53 é um tetrâmero que pode ligar-se a seqüências específicas e assim transativar um grupo de genes. Vários estudos indicam que a P53 atua diferentemente nos promotores resultando numa ligação diferencial ao DNA. Além dessa habilidade em funcionar

como transativadora, ela pode reprimir a transcrição de inúmeros genes celulares e virais, inibindo assim a expressão dos mesmos (ARGARWAL et al., 1998).

A proteína P53 desempenha um importante papel, pois ao preservar a integridade do genoma celular, ela protege as células de transformação maligna. Quando ocorre um dano no DNA, a P53 age provocando uma parada do ciclo celular, levando a várias respostas biológicas que reparam efetivamente o dano ocorrido. Nesse sentido, os pontos de verificação do ciclo celular são essenciais para prevenir tanto a replicação do DNA alterado (parada em G1), como a segregação de cromossomos danificados (parada em G2). Essas paradas transitórias permitem que o DNA seja reparado antes de decisões celulares críticas, prevenindo que células com genoma alterado progridam para a replicação do DNA ou para a mitose. Por isso, a perda da atividade da P53 é encontrada com grande frequência nos diversos tipos de neoplasias malignas humanas (MOLL; SCHRAMM, 1998).

Apesar de dados extensos no tocante a mutações no gene p53 relacionados à tumorigênese, os conhecimentos sobre seus reguladores celulares como o gene mdm2 e sua proteína são mais restritos e recentes, além de que as vias de sinalização ainda não foram totalmente esclarecidas.

O gene mdm2 (murine double minute 2) foi originalmente clonado a partir de células Balb/c3T3 que sofreram transformação espontânea. Quando superexpresso, este gene mostrou ser capaz de aumentar o potencial tumorigênico nestas células (FAKHARZADEH; TRUSKU; GEORGE et al., 1991).

O gene mdm2 é um proto-oncogene, localizado no cromossomo humano 12q13-14, que atua de uma maneira transdominante negativa, impedindo a função de transativação do gene p53, podendo inibir desta maneira a sua função

supressora de tumor. Fisiologicamente existe um equilíbrio entre esses dois genes, porém em condições neoplásicas, o gene mdm2 pode apresentar-se alterado de maneira independente do status do gene p53 (MICHAEL; OREN, 2002).

Portanto, o mdm2 constitui um potente regulador negativo da P53 que, por meio da sua proteína correspondente, inibe a atividade da P53 de diferentes maneiras: a) a proteína MDM2 se liga ao domínio de transativação da P53 para antagonizar sua ação sobre o DNA, impedindo a sua atividade transcricional, b) agindo como uma E3 ligase, isto é, tornando a P53 alvo para degradação proteossômica e c) aumentando o transporte da proteína P53 para o citoplasma, local onde ocorre sua degradação (MICHAEL; OREN, 2002).

Contrariamente, em células normais, mediante sinais de estresse, a ligação entre a MDM2 e P53 é bloqueada ou modificada, permitindo a ativação da função supressora de tumor da P53. Deste modo, o que existe é um mecanismo de retroalimentação, no qual a P53 regula o aumento da concentração de MDM2, enquanto a MDM2 é responsável pela diminuição nos níveis da proteína P53, visto que a MDM2 transporta a proteína P53 para fora do núcleo, onde ela é finalmente degradada (MICHAEL; OREN, 2002; VOUSDEN; LU, 2002; WEBER et al., 2002).

A proteína MDM2 tem a capacidade de se unir a ambas as formas da P53 (selvagem e mutante). Esse fato foi observado por Momand, Wu e Dasgupta (2000) que utilizaram os anticorpos pab 421 e pab 1801 (específico para a forma mutante) em uma linhagem celular proveniente de fibroblastos embrionários de rato que expressa a forma mutante da proteína P53.

Foi observada superexpressão da proteína MDM2 em muitos tumores malignos humanos, incluindo 30% dos sarcomas de tecido mole e 7% dos tumores sólidos, incluindo carcinomas de mama, ovário, pulmão, cólon e próstata. Além

disso, a superexpressão dessa proteína nestes tumores correlaciona-se com pobre prognóstico (YANG et al., 2006).

Um dos alvos do p53 selvagem é o P21^{WAF1}. O gene P21 foi identificado usando-se uma técnica de hibridização com o objetivo de identificar genes induzidos pelo p53 selvagem, mas não pelo mutante em linhagem celular de tumor cerebral humano. O seu produto, uma proteína de 21kDa, é considerado inibidor universal das quinases dependentes de ciclinas (CDK) que são de fundamental importância para a progressão do ciclo celular na transição da fase G1 para a fase S (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999).

Além disso, a proteína P21^{WAF1} pode interagir com antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e controlar o reparo do DNA. Esses 2 mecanismos são dependentes das proporções relativas de P21^{WAF1}, CDK e PCNA (LUO; HURWITZ; MASSAQUE, 1995).

Um outro fato interessante recentemente descoberto é que a MDM2 e a P21 podem se ligar in vivo e in vitro. A MDM2 age como um regulador negativo da P21, promovendo diretamente sua degradação, pois facilita a ligação da P21 com a subunidade C8 proteossômica (do 20S proteossome). Foi observado que na presença de superexpressão de MDM2, a P21, quando presente, estava sempre em baixos níveis (ZHANG et al., 2004).

A proteína pAKT, também conhecida como proteína quinase B, é importante nos mecanismos de sobrevivência e proliferação celular em processos fisiológicos e neoplásicos. Para ser ativado, o pAkt vai depender da disponibilidade intracelular de PI3-K (fosfatidilinositol-3 kinase). Quando na presença de sinais extracelulares, esta molécula é recrutada para a membrana plasmática onde fosforila uma outra molécula, PIP2, gerando PIP3 que é responsável pelo recrutamento do AKT. Uma

vez na membrana plasmática, o Akt sofre fosforilações em diferentes sítios e, quando ativada, essa proteína passa a ter localização citoplasmática e nuclear (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Uma vez ativado, o Akt fosforila diversas proteínas, incluindo proteínas reguladoras diretas da sobrevivência celular, fatores de transcrição e outras proteínas quinases que regulam o metabolismo celular e a síntese protéica (DUBSKA, ANDERA; SHEARD, 2005).

Essa via descrita anteriormente é a forma clássica de ativação do AKT, porém um estudo recente conduzido por Wang e Brattain (2006) mostrou e provou que o AKT pode ser ativado também no núcleo, mas essa forma de ativação ainda não foi completamente desvendada.

O Akt é um regulador crítico da sobrevivência celular. Um grande número de estudos têm demonstrado que a transfecção de uma variedade de tipos celulares com alelos AKT ativos (ou AKT selvagem) bloqueia a apoptose induzida por estímulo apoptótico (radiação ultra-violeta, discordância do ciclo celular, dano ao DNA e tratamento de células com anticorpo anti-fas ou TGF β) (DATTA; BRUNET; GREENBER, 1999).

Com relação à proliferação nuclear, o Akt possui amplo espectro de ação ao promover ou impedir a ação de diversas proteínas relacionadas ao ciclo celular, dentre elas P21, MDM2 e P53.

Recentemente foi observado que a AKT apresenta a capacidade de modular a atividade da p53, através da proteína MDM2. A proteína AKT se liga à MDM2 e a fosforila em pelo menos 2 sítios dentro de seu domínio central (nas serinas 166 e 186), sendo que essa ligação permite que a MDM2 sofra translocação do citoplasma para o núcleo, onde é requerida para se ligar à P53 e levá-la à inativação, ubiquitinação e degradação. Portanto, a pAKT é requerida para a atividade da

MDM2. Sinais de sobrevivência que aumentam a atividade da pAKT irão potencializar os efeitos inibitórios da MDM2 e atenuar a resposta da p53, fornecendo uma explicação atrativa para a habilidade da pAKT em interferir com a apoptose mediada pela p53 (CARLSON; LONGAKER; THOMPSON, 2004).

Sendo assim, a inibição do Akt bloqueia a entrada de MDM2 no núcleo, promovendo a permanência de MDM2 no citoplasma, onde esta proteína será degradada (MAYO; DONNER, 2002).

A proteína pAKT encontra-se superexpressa em carcinomas de mama, próstata, pulmão, cabeça, pescoço e melanomas (LIM et al., 2005). A via de sinalização do Akt desempenha importante papel na inibição da apoptose e, deste modo, parece contribuir na patogênese de certas neoplasias (ZHOU et al., 2001).

Em um estudo preliminar conduzido por Cheng et al. (1997), observou-se que, na superexpressão de Akt, havia progressão e aceleração do ciclo celular. O Akt possivelmente tem papel na progressão entre as fases G1-S. Essa progressão é controlada pela proteína pRb que suprime a transcrição dos genes responsáveis por esta passagem. As proteínas CDK (ciclina dependentes de quinase) 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. Em células estimuladas à proliferação, p21 e p27 passam do núcleo para o citoplasma onde são fosforiladas pelo Akt; por consequência, o ciclo deixará de sofrer o controle promovido por estas proteínas.

Ogawara et al. (2002) realizaram um estudo com o objetivo de investigar o mecanismo pelo qual a AKT antagoniza a ação da P53. Encontraram que a expressão da AKT reduz os níveis protéicos da P53 pelo menos em parte pelo aumento da degradação da P53. Quando na presença de expressão de AKT e

tratamento com soro foi observada indução de fosforilação da MDM2 na Serina 186 em linhagens celulares.

2.3 MDM2, P53, P21^{WAF1} e pAKT – Interação e expressão em neoplasias

Estudando uma série de 52 casos de fibrohistiocitomas malignos, Reid et al. (1996) realizaram testes com o objetivo de avaliar a amplificação do gene mdm2, mutações no gene P53 e acúmulo da proteína P53 e, ainda, relacionaram essas variáveis com a sobrevida geral dos pacientes. A amplificação do gene mdm2 foi encontrada em 29% dos casos e 12% demonstraram mutações no gene P53. Além disso, 15% dos casos analisados exibiram expressão imunoistoquímica para a proteína P53 em mais de 10% das células tumorais. No período estudado, com acompanhamento médio de 10,8 anos, a presença da amplificação do gene mdm2, o acúmulo da proteína p53 e alterações genéticas da p53 não tiveram um efeito significativo na sobrevida geral dos pacientes.

Araújo et al. (1997) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a relação entre a expressão da proteína P53 e o grau histológico de malignidade em carcinomas epidermóides bucais. Em seus resultados, 62,5% dos carcinomas apresentaram marcação positiva para a proteína P53. Além disso, os autores encontraram uma correlação entre a expressão da proteína P53 e o grau histológico de malignidade, mostrando que a superexpressão de P53 é um indicador de pobre prognóstico para carcinoma epidermóide bucal.

Com a finalidade de avaliar o papel do gene p53 na tumorigênese pulmonar, Wang et al. (1998) examinaram a frequência e o espectro de mutações do p53 em 97 pacientes que apresentavam câncer pulmonar que não o de pequenas células. Os autores encontraram uma frequência relativamente reduzida de mutação do p53 com uma frequência muito maior de superexpressão da proteína P53 (37 casos), refletindo uma estabilização dessa proteína na ausência de mutação do gene p53. Observaram, também, que 95% dos casos não apresentavam expressão da proteína MDM2, associados com a perda de atividade da proteína pAKT.

Broll et al. (1999) investigaram a expressão do mRNA do p53 e mdm2 e de suas proteínas em amostras de carcinomas colo-retais e em tecidos colo-retais normais. O mRNA do p53 foi detectado em 80% dos tumores e em 67% dos tecidos normais analisados. Além disso, a expressão nuclear da proteína P53 foi observada em 55% dos espécimes tumorais e em nenhum tecido normal. Com relação ao mRNA do mdm2, observou-se expressão em 87% dos tumores e em apenas 17% dos tecidos normais. A proteína MDM2 foi observada em 31% dos casos no núcleo e em 86%, no citoplasma das amostras tumorais, enquanto que o grupo representativo dos tecidos normais expressou essa proteína apenas no citoplasma (em 13% dos casos). Foram encontradas associações significativas entre o mRNA do p53 e sua proteína, entre os mRNA dos genes p53 e mdm2 e também entre o mRNA do mdm2 e a sua proteína, suportando a existência de um mecanismo regulatório envolvendo o p53 e o mdm2.

Com o objetivo de avaliar a inter-relação entre a expressão das proteínas P53, MDM2 e P21 na carcinogênese gástrica, Craanen et al. (1999) realizaram um estudo imunoistoquímico em mucosa gástrica normal, gastrite crônica, carcinomas gástricos precoces e lesões precursoras para as proteínas supra-citadas. Foi

observada expressão de P21 na ausência de P53 e MDM2 em mucosa gástrica normal, gastrite crônica e metaplasia intestinal. Houve expressão de P53 em 60% dos carcinomas avaliados e de P21 em 80%, mas não foi possível detecção da proteína MDM2. Os autores concluíram que a expressão de P21 em mucosa não neoplásica deve estar relacionada à senescência celular ou diferenciação terminal, talvez de uma maneira independente do P53.

Através de reações imunoistoquímicas, Koontongkaew et al. (2000) estudaram a imunoexpressão da proteína p53 em 53 casos de carcinomas epidermóides de boca e de faringe. Foi detectada expressão da proteína P53 em 50,94% dos casos. Esse resultado sugere que a expressão aumentada da P53 pode contribuir para o desenvolvimento de câncer bucal e de faringe.

Gohring et al. (2001) avaliaram a expressão imunoistoquímica da proteína P21 em câncer de mama invasivo e analisaram se essa proteína apresenta impacto prognóstico. Para isso, realizaram reações imunoistoquímicas contra a proteína P21 em 307 tecidos originários de câncer de mama e correlacionaram a expressão com fatores relacionados à sobrevida e seguimento clínico. Dos casos estudados, 32,2% dos tumores foram considerados P21 positivos. Pôde-se concluir que a detecção imunoistoquímica da P21 não parece ser um fator prognóstico útil para se decidir sobre o tratamento do câncer de mama.

Wong et al. (2001) estudaram a expressão imunoistoquímica da proteína P21 em 40 carcinomas ductais invasivos de mama e em 40 tecidos ductais normais adjacentes. Observaram que 90% das neoplasias e 10% dos tecidos adjacentes normais expressaram a proteína P21.

Mathew et al. (2002) examinaram 100 pacientes com carcinoma de esôfago e encontraram que a expressão da proteína MDM2 foi o fator de risco mais significativo associado com metástases à distância.

Kourea et al. (2003) investigaram a expressão imunoistoquímica de P53 e de P21 e o valor prognóstico dessas proteínas em 94 carcinomas ductais de mama com linfonodos negativos. Encontraram uma expressão positiva para a proteína P21 em 48 tumores, sendo 21 casos positivos para a proteína P53. A expressão de P53 foi relacionada a tumores de alto grau, mas não a recorrências, metástases, sobrevida livre de doença e sobrevida geral. A expressão de P21 não foi associada a nenhum dos parâmetros examinados.

A expressão imunoistoquímica das proteínas P53 e MDM2 e o status do gene p53 foram examinados em ameloblastomas e germes dentários, com o objetivo de se avaliar o possível envolvimento do p53 e MDM2 em tumores do epitélio odontogênico. Nesse estudo, foi observado acúmulo de P53 nos ameloblastomas benignos e malignos, enquanto que os tecidos de germes dentários mostraram pouca ou nenhuma expressão dessa proteína. Mutações gênicas do p53 (exons 5-8) não foi detectada, quando analisados 10 ameloblastomas benignos e 1 ameloblastoma maligno, fato que sugere que mutação do gene p53 não é essencial para o desenvolvimento de mudanças neoplásicas do epitélio odontogênico. Germes dentários mostraram alta reatividade imunoistoquímica para MDM2 comparado com P53, indicando que a MDM2 atua de certa forma no desenvolvimento dentário. Nesse estudo, a expressão de MDM2 foi maior em ameloblastomas que em germes dentários, sugerindo que essa proteína está envolvida na oncogênese ou na transformação neoplásica do epitélio odontogênico. Os autores concluíram que o sistema de regulação do ciclo celular P53-MDM2 parece estar relacionado à

estruturação tecidual e citodiferenciação de ameloblastomas (KUMAMOTO et al., 2004).

Lim et al. (2005) investigaram a associação entre a expressão de pAKT e fatores prognósticos em carcinomas epidermóides orais (CEO). Realizaram estudo imunoistoquímico em 84 casos de CEO, sendo que destes, 29 exibiram expressão da proteína pAKT. Os autores observaram associação entre a expressão dessa proteína e presença de metástase em linfonodos e concluíram que a expressão do pAkt é um indicador prognóstico significativo para carcinoma epidermóide oral e que a inibição do Akt é uma possível abordagem molecular para o tratamento dessas lesões.

Espécimes de câncer pulmonar que não o de pequenas células de um grupo de 94 pacientes foram coletadas e examinadas por Wang et al. (2005) para se avaliar o espectro de mutação do p53 e a expressão da proteína P53. Em adição, os autores analisaram a expressão da proteína MDM2 para avaliar se o acúmulo da proteína P53 pode resultar de um mecanismo alternativo que leva à estabilização dessa proteína. Os dados indicaram que em 92% dos pacientes (35 dos 38) com superexpressão da P53, a expressão da MDM2 estava diminuída. Além disso, as alterações dos genes p53 e mdm2 mostraram-se associadas com cânceres de pulmão em estágios mais avançados e com prognósticos pobres. Os autores concluíram que a baixa expressão da MDM2 contribui para o acúmulo da proteína P53 selvagem e que o desequilíbrio do sistema P53-MDM2 é importante na patogênese de pacientes com câncer de pulmão que não de células pequenas.

Com o objetivo de investigar se a ubiquitinação da P53 mediada pela MDM2 está associada com apoptose de células epiteliais em fibrose pulmonar idiopática (FPI) e pneumonia intersticial não-específica (PINE), Nakashima et al. (2005)

estudaram, através dos métodos da imunoistoquímica e Western Blotting, amostras de pulmão obtidas através de biópsia de pacientes com essas enfermidades e compararam-nas a amostras de tecido pulmonar normal. Os autores observaram que as proteínas: P53, MDM2 e P21 mostraram superexpressão em células epiteliais de pacientes com FPI e PINE comparado com o parênquima pulmonar normal. Exceto para a P21, houve um aumento significativo na expressão desses fatores em FPI comparado com PINE.

Com o objetivo de investigar a via do p53 em hemangiopericitomas de meninges (MHPCs), Martinez et al. (2005) estudaram as proteínas P53, MDM2 e P21^{WAF1} através da imunoistoquímica e imunofluorescência dupla, em 18 MHPCs (11 primários e 7 recorrentes). Os autores encontraram expressão simultânea de P53, MDM2 e P21^{WAF1} em todos os casos, fato que indica que não há mutação do P53, já que as proteínas MDM2 e P21 são transativadas apenas pelo P53 selvagem. Superexpressão de MDM2 foi observada em 55% dos casos. Os resultados obtidos através da imunofluorescência dupla mostraram freqüente co-localização de MDM2 e P53, o que sugere que o MDM2 se liga e inativa a P53, através de um mecanismo diferente da mutação.

Dworakowska et al. (2005) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a relevância do índice de apoptose considerado sozinho ou associado à expressão de proteínas que controlam a fase G1 do ciclo celular, dentre elas P53, MDM2 e P21, em câncer pulmonar que não o de pequenas células. O estudo incluiu 50 pacientes que foram submetidos à ressecção pulmonar curativa. Para avaliar o índice de apoptose (IA) foi utilizada a técnica de TUNEL, onde o IA foi definido como o número de células apoptóticas por 1000 células tumorais e a expressão das proteínas foi avaliada imunoistoquimicamente. A média do IA calculada foi de 14, sendo que ele

não estava correlacionado com as características clínicas dos pacientes nem com a expressão das proteínas P53 e P21. Foi encontrado, porém, que IA menor que esse valor estava associado com a superexpressão de MDM2.

Pellikainen et al. (2006) avaliaram a expressão e a relevância prognóstica do P21^{WAF1} em 420 pacientes com carcinoma de mama e investigaram sua associação com a expressão de P53 e com os parâmetros clínico-patológicos e de sobrevida. Em termos gerais, foi encontrada uma expressão baixa de P21 em carcinomas de mama, sendo os tumores P21 positivos freqüentemente associados à expressão P53 positiva, indicando que em câncer de mama a regulação do P21 ocorre principalmente devido à via do P53. A alta positividade nuclear de P21 estava associada a pobre diferenciação, porém não estava relacionada à recorrência ou à sobrevida.

Com a finalidade de determinar se a via de sinalização do PI3K/Akt estaria envolvida na patogênese de linfomas, Rudelius et al. (2006) investigaram o status de fosforilação do Akt e de alvos downstream em linhagens celulares e blocos derivados de linfomas. Observaram que o AKT estava fosforilado em todos os casos de linfoma agressivos (12 dos 12 casos e 4 das 4 linhagens celulares). Em contraste, o Akt fosforilado estava presente em apenas 5 dos 16 casos de linfomas de baixo grau. Observaram, ainda, que a expressão de p-AKT estava acompanhada da fosforilação de proteínas downstream, incluindo a MDM2 e a inibição da via PI3K-AKT reduziu a fosforilação do MDM2, levando à parada do ciclo celular ou apoptose. Os autores concluíram que a ativação da via do PI3K/Akt contribui para a patogênese dos linfomas.

Yang et al. (2006) demonstraram que a proteína MDM2 está relacionada à ocorrência de metástases, uma vez que ela se liga à caderina-E, in vivo, levando-a

para a degradação. Como a proteína Caderina-E é uma proteína de adesão celular, a perda de sua expressão aumenta a chance de metástases.

2.4 MDM2, P53, P21^{WAF1} e pAKT – Interação e expressão em neoplasias de glândula salivar

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de se desvendar a participação das proteínas previamente descritas na tumorigênese e no comportamento de neoplasias de glândulas salivares.

Soini et al. (1992) estudaram a expressão da proteína P53 em um grupo de 51 neoplasias de glândula salivar, incluindo 7 carcinomas adenóides císticos (CAC) e 3 adenocarcinomas. Dos 51 tumores de glândula estudados, somente 8 (16%) mostraram positividade para esta proteína, sendo 3 benignos e o restante, malignos. Dos malignos, 3 eram carcinomas mucoepidermóides e 2 adenocarcinomas. Os autores atribuíram a positividade para a P53 encontrada nessas neoplasias a um mecanismo até então desconhecido, não necessariamente relacionado à mutação gênica.

Gallo et al. (1995) analisaram a relação entre a expressão imunoistoquímica da proteína P53, o comportamento clínico, assim como a sobrevida de pacientes que apresentavam neoplasias benignas e malignas de parótida (incluindo 10 CAC e 5 adenocarcinomas). Marcação positiva foi detectada em 11% dos tumores benignos e em 67% dos malignos, incluindo 8 CAC (80%) e 2 adenocarcinomas (40%). As neoplasias que exibiram marcação moderada e intensa geralmente eram maiores e

mais avançadas e no momento do diagnóstico, comumente apresentavam sinais de agressividade local. Foi observado, também, que expressão alta e moderada de P53 estava associada significativamente com metástases regionais e à distância, menor sobrevida e menor período livre da doença.

Papadaki et al. (1996), com o objetivo de observar mutações no gene p53 e expressão das proteínas P53 e P21, estudaram um grupo de 14 carcinomas adenóides císticos, sendo 7 primários e 7 recorrentes. O status do gene p53 foi analisado pela técnica de PCR com a amplificação dos exons de 5 a 8 e a análise das proteínas foi realizada pela técnica de imunoistoquímica. Dos 7 casos primários, 6 foram negativos para a P53 e dos 7 casos recorrentes, 4 foram positivos para essa proteína, com vários graus de imunomarcção. Dois dos tumores com marcação mais intensa mostraram alterações genéticas. No caso em que o mesmo paciente apresentava tumor primário e recorrente, somente o recorrente mostrou uma mutação pontual. Os autores observaram, ainda, que todos os casos foram negativos para o P21^{WAF1}. Com base nos resultados acima, foi sugerido que mutações no gene p53 são eventos importantes que devem estar envolvidas em estágios mais tardios da progressão de carcinoma adenóide cístico.

Karja et al. (1997) examinaram 219 neoplasias de glândula salivar quanto à expressão imunoistoquímica da proteína p53 mutante e selvagem e algumas dessas lesões quanto à presença de mutações pela técnica da PCR-SSCP. O acúmulo da P53 foi observado em 45% dos tumores: em 36% dos tumores benignos e em 54% dos carcinomas, sendo que a expressão mais intensa foi encontrada no carcinoma adenóide cístico (69%). Foi realizado o polimorfismo de conformação de fita única sendo encontrado padrão de eletroforese alterado sugestivo de mutação em 2 dos 20 casos negativos para a expressão da proteína (no exon 5 em um

adenocarcinoma e no exon 6 em um tumor de Warthin) e em 4 dos 20 casos positivos analisados (no exon 6 e 8/9 em 2 adenomas pleomórficos, no exon 5 em um carcinoma epidermóide e no exon 8/9 em um carcinoma indiferenciado). A expressão da P53 não mostrou nenhuma correlação com o comportamento clínico das lesões, porém os carcinomas que exibiam mutação no p53 mostraram um comportamento clínico mais agressivo.

Em um estudo com carcinomas adenóides císticos de glândulas salivares menores, Queiroz (1997) não observou expressão imunoistoquímica da proteína P53 em nenhum dos casos avaliados.

Zhu, White e Tipoe (1997) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a marcação imunoistoquímica para P53 em carcinomas adenóides císticos e correlacionar com a sobrevida dos pacientes. Foram estudados 27 casos (12 originados da parótida e 15 de glândulas palatinas menores) que foram comparados com 10 amostras de parótida normal e 10 de glândulas palatinas (controles negativos). A sobrevida dos pacientes foi avaliada por um período de 156 meses. Os resultados mostraram que os tecidos normais não exibiram marcação para P53, enquanto que 87% dos carcinomas adenóides císticos do palato e 17% dos casos originados da parótida mostraram marcação nuclear positiva para essa proteína, sendo que a marcação variou de 0,01 a 10%. Os dados mostraram que o número de tumores positivos para P53 foi significativamente maior no grupo de lesões derivadas do palato e que pacientes com marcação positiva para a proteína apresentaram baixa taxa de sobrevida. O estudo sugere que a proteína P53 pode estar envolvida no desenvolvimento de carcinoma adenóide cístico e que a análise dessa proteína pode ser um indicador útil de pobre prognóstico.

Cheuk, Chan e Ngan (1999), estudando as áreas indiferenciadas em 3 carcinomas adenóides císticos de glândulas salivares, observaram maior expressão da proteína P53 em células indiferenciadas, sugerindo que a mutação no gene p53 pode ser um mecanismo envolvido na indiferenciação nessas neoplasias.

Araújo et al. (2000a) avaliaram 20 tumores de glândulas salivares menores, incluindo 7 adenocarcinomas polimorfo de baixo grau, 8 carcinomas adenóides císticos, 3 adenocarcinomas de células acinares e 2 adenomas pleomórficos através da expressão imunoistoquímica da proteína MDM2 e do status do gene p53 através da técnica PCR. Os autores não observaram nenhuma alteração sugestiva de mutação do gene p53 (exons 5 a 8), porém observaram uma intensa expressão imunoistoquímica para a proteína MDM2 em todas as lesões analisadas. Os resultados obtidos sugeriram um mecanismo alternativo envolvido com a tumorigênese de glândulas salivares.

Chau et al. (2001) realizaram reações imunoistoquímicas e estudos moleculares para estudar o p53 em 1 caso de carcinoma adenóide cístico indiferenciado. O componente indiferenciado exibiu marcação positiva forte e difusa para a proteína P53, enquanto que o componente CAC mostrou positividade focal fraca a moderada para a proteína. Com relação ao estudo do gene, o componente indiferenciado exibiu mutação do exon 5 do gene p53, enquanto que a porção CAC não mostrou qualquer mutação genética. Os autores sugeriram um papel importante do p53 na indiferenciação do carcinoma adenóide cístico.

Kiyoshima et al. (2001) estudaram a alteração do gene p53 (exons 5 a 8) e a expressão imunoistoquímica de sua proteína em 17 amostras de carcinomas adenóides císticos. Foram detectadas alterações do p53 em 17,6% das lesões estudadas, sendo que as alterações ocorreram sempre em carcinomas originários

de glândulas salivares menores. As lesões apresentaram variação da marcação, entre 0 a 78,1%, sendo que as lesões com mutação do gene p53 exibiram o menor grau de marcação. O estudo sugere que não existe correlação entre alterações genéticas do p53 e a marcação imunoistoquímica no carcinoma adenóide cístico.

Schlott et al. (2001) analisaram o status do gene mdm2 e a expressão imunoistoquímica de sua proteína em tumores benignos e malignos de glândulas salivares (6 adenomas pleomórficos, 3 tumores de Warthin, 1 adenocarcinoma, 1 adenocarcinoma de células basais, 1 carcinoma mucoepidermóide, 3 carcinomas de células acinares, 2 carcinomas adenóides císticos). Os autores não observaram alterações no gene MDM2, porém foi notado acúmulo nuclear da proteína MDM2 em 3 tumores malignos (1 adenocarcinoma de células basais, 1 carcinoma mucoepidermóide e 1 adenocarcinoma), ao passo que nenhum tumor benigno expressou a proteína.

Roijs et al. (2002) realizaram um estudo objetivando identificar e caracterizar eventos genéticos que levam à translocação, deleção, amplificação e superexpressão do gene mdm2 em um carcinoma ex adenoma pleomórfico em estágio inicial de desenvolvimento. Esses resultados sugerem que a amplificação e a superexpressão do mdm2 parece ser evento genético importante que pode contribuir para a transformação maligna do adenoma pleomórfico.

Dorta (2003) estudou a expressão imunoistoquímica das proteínas P53, P21^{WAF/Cip1}, MDM2 e P14^{ARF} em carcinomas adenóides císticos de glândulas salivares menores, parótida e submandibular, bem como em glândulas salivares não neoplásicas. Os resultados demonstraram positividade variável para a proteína P53 nos tumores analisados, enquanto que a expressão da proteína P21^{WAF/Cip1} foi negativa em 100% dos casos. Observou-se, ainda, considerável marcação para as

proteínas MDM2 e P14^{ARF} tanto nos carcinomas adenóides císticos como nas glândulas salivares não neoplásicas, mas que se mostrou heterogênea neste último grupo, dando indícios de que glândulas salivares menores, parótida e submandibular estejam sujeitas a diferentes mecanismos fisiológicos de controle da proliferação celular. Desta forma, a análise comparativa da expressão da proteína MDM2 por localização revelou um aumento significativo nos carcinomas adenóides císticos de parótida e glândulas salivares menores em relação às glândulas salivares não neoplásicas correspondentes, enquanto que para a proteína P14^{ARF} foi evidenciada uma elevação significativa exclusivamente nos tumores de glândulas salivares menores. Estes resultados sugerem que alterações na proteína P53 e sua conseqüente incapacidade de induzir a transcrição do gene WAF1/Cip1 desempenhem um papel importante no desenvolvimento do carcinoma adenóide cístico. Somando-se a estes eventos, o aumento na expressão da proteína MDM2 parece contribuir na carcinogênese dos carcinomas adenóides císticos de parótida e glândulas salivares menores, ao passo que a elevação dos níveis da P14^{ARF} em tumores de glândulas salivares menores pode representar um mecanismo de compensação ao acúmulo inadequado de MDM2.

Jia et al. (2004) investigaram a expressão imunoistoquímica das proteínas P53 e MDM2 em 39 carcinomas adenóides císticos. 64,1% dos casos foram positivos para a proteína P53 e 76,9% para a proteína MDM2. Os autores observaram que os pacientes com expressão positiva de P53 apresentaram uma sobrevida menor em relação aos com P53 negativos. Notaram, ainda, uma co-expressão de P53 e MDM2 em 56,4% dos casos estudados.

Mantesso et al. (2004) pesquisaram a expressão do mRNA do gene mdm2, correlacionando-a com a imunoexpressão das proteínas P53 e P21 em linhagens

celulares de neoplasias de glândulas salivares. Para tanto, os autores utilizaram a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) diferencial e imunofluorescência. Além da superexpressão de mdm2 na maioria das linhagens celulares estudadas, foi observada uma marcação para a proteína P53 variável nas neoplasias malignas e ausente nas benignas. A marcação para a proteína P21 foi encontrada somente nas neoplasias benignas, sendo restrita a poucas células. Foi sugerido que a superexpressão de mdm2 pode estar envolvida na gênese das neoplasias de glândula salivar e que a participação de p53, p21 e mdm2 nessas neoplasias ocorre de forma variada e depende da neoplasia em questão.

Alves et al. (2004) estudaram a expressão imunoistoquímica da proteína P53 em neoplasias de glândula salivar derivadas da glândula submandibular. Encontraram que 20% dos carcinomas adenóides císticos analisados exibiram marcação positiva para essa proteína.

Affolter et al. (2005) analisaram a expressão das proteínas P21 e P53 em tumores de glândulas salivares, sendo que 9 eram CAC e 5, adenocarcinomas através de ensaio imunoistoquímico e, ainda, através da TSA-imunoistoquímica com objetivo de aumentar a sensibilidade da técnica. Os autores observaram que 72% dos tumores mostraram marcação fraca a negativa na imunoistoquímica convencional para a proteína P21, mas nenhum caso foi negativo quando utilizada a TSA-imunoistoquímica. Com relação ao P53, só foi utilizada a técnica TSA-imunoistoquímica e os autores verificaram que todos os CAC foram negativos para P53, enquanto todos os adenocarcinomas expressaram a proteína em níveis variados.

Freitas et al. (2005), com o objetivo de encontrar marcadores para tornar o diagnóstico do carcinoma ex adenoma pleomórfico mais objetivo, estudou a

marcação imunoistoquímica de algumas proteínas, dentre elas a P53 em adenomas pleomórficos (AP) e em carcinomas ex adenomas (CEAP) em fase precoce de transformação maligna. Em todos os casos de CEAP, houve marcação de P53 nas células luminais das áreas benignas e principalmente das malignas. Poucas células mioepiteliais benignas foram positivas para P53. Os autores concluíram que a P53 pode estar envolvida num estágio precoce de malignização do adenoma pleomórfico.

Kishi et al. (2005) avaliaram o status dos genes p53 e p21 e a expressão imunoistoquímica das proteínas P53 e MDM2 em carcinomas de glândulas salivares, dentre estes, 17 carcinomas adenóides císticos e 2 adenocarcinomas. Mutações do gene p53 (exons 5 e 8) foram observadas em 3 CAC e expressão positiva da proteína P53 foi observada em 2 CAC, sendo que estes também apresentavam mutação no gene p53. Com relação ao gene p21, não foram notadas alterações. Além disso, nenhum dos casos estudados mostrou expressão de MDM2.

Com o objetivo de avaliar o status do gene p53 (exons 5-8), Matizonkas-Antônio et al. (2005) realizaram testes de PCR em neoplasias de glândulas salivares, incluindo 3 lesões de carcinomas adenóides císticos. Os autores observaram que os 3 casos de CAC analisados apresentaram mutações no gene p53.

Num estudo de metanálise, Dodd e Slevin (2006) analisaram estudos que avaliaram a marcação imunoistoquímica do carcinoma adenóide cístico para a P53. O estudo cita que os resultados são controversos, mostrando uma marcação fraca ou ausente em 20% a 100% dos CAC.

Luukkaa et al. (2006) estudaram a expressão imunoistoquímica da proteína P53 em 212 casos de neoplasias malignas de glândula salivar e acompanharam os

pacientes por 5 anos. Os autores analisaram se a expressão da P53 apresentava correlação com fatores relacionados à sobrevida e concluíram que não existe uma relação estatisticamente significativa.

Perez et al. (2006) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os fatores prognósticos clínicos, histológicos e imunoistoquímicos em uma série de 129 carcinomas adenóides císticos. Os autores concluíram que o estágio clínico, o padrão de crescimento sólido e a expressão imunoistoquímica positiva para a proteína P53 foram os fatores mais relacionados com pobre prognóstico nos pacientes com carcinoma adenóide cístico. Dos tumores estudados, 21,3% foram positivos para a proteína P53.

Sato et al. (2006) relataram um caso de carcinoma adenóide cístico (CAC) do seio maxilar que apresentava 3 componentes histológicos diferentes: adenocarcinoma de alto grau, CAC sólido e CAC de baixo grau (padrão tubular ou cribriforme). A marcação para a proteína P53 foi positiva em mais de 50% das células em ambas as áreas de adenocarcinoma de alto grau e de CAC sólido, enquanto foi negativa na porção CAC de baixo grau. Os autores sugerem que a superexpressão de P53 parece estar envolvida na progressão de CAC de baixo grau para CAC sólido e adenocarcinoma de alto grau.

De acordo com o acima exposto, os estudos sugerem que há um mecanismo alternativo relacionado à tumorigênese das glândulas salivares independente da mutação do p53 e associado a interações entre proteínas. Dessa forma, novas pesquisas devem ser realizadas para elucidar a real participação das inúmeras proteínas envolvidas com a Mdm2, assim como as interações existentes entre elas, visando o melhor entendimento dos mecanismos de formação, do comportamento

biológico e, assim, proporcionando condições para o aprimoramento do tratamento destes tipos de neoplasias.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo é avaliar a expressão das proteínas MDM2, P53, P21^{WAF1} e pAKT em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma não-específico de glândula salivar através das técnicas de imunoistoquímica, western blotting e imunofluorescência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer número 133/05 (Anexo A).

4.1 Casuística e análise morfológica

Foram selecionados dos Arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e do Hospital do Câncer A.C. Camargo blocos representativos de carcinoma adenóide cístico (10 casos) e adenocarcinoma não-específico (3 casos).

Cortes corados em hematoxilina e eosina dos tumores foram submetidos a um estudo morfológico em microscopia de luz realizado por três patologistas experientes para confirmação do diagnóstico e classificação do carcinoma adenóide cístico em subtipos histológicos. Os tumores seguiram, então, para o estudo imunoistoquímico através da técnica da streptavidina-biotina, sendo que os cortes foram submetidos aos anticorpos primários anti-P53, anti-MDM2, anti-P21^{WAF1} e anti-pAKT.

4.2 Técnica imunoistoquímica

10 casos de carcinoma adenóide cístico e 3 casos de adenocarcinoma não específico previamente fixados em formol, a 10% e emblocados em parafina foram seccionados com a espessura de 3 μ m e estendidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto, secas e mergulhadas por dois minutos em solução de 3-aminopropyltriethoxysilano (Sigma Chemical CO., St Louis, MO/USA) a 10% em álcool absoluto. Seguiu-se à desparafinização em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram reidratados em série descendente de etanóis, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidas por etanol 95%, 85% e 80% durante 5 minutos cada. Com a finalidade de se remover o pigmento formólico, os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol 95% durante 10 minutos. Procedeu-se, então, à lavagem em água corrente e água destilada e as lâminas seguiram para os tratamentos de recuperação antigênica, caso fosse necessário.

A recuperação antigênica das proteínas MDM2 e P21^{WAF1} foi realizada com ácido cítrico (10mM, pH 6.0) em banho-maria a 95°C durante 30 minutos.

Para a recuperação antigênica da proteína P53 foi utilizada solução de EDTA (1mM, pH 8.0) em banho-maria a 95°C durante 30 minutos. Ao contrário, a proteína pAKT não necessitou de tratamento para recuperação antigênica.

Após o tratamento, quando necessário, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, seguidas por 2 banhos em água deionizada. Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com 2 banhos de 15 minutos em

solução de H₂O₂ 20 volumes (6%) e metanol (1:1). Os cortes foram lavados novamente por 10 minutos em água corrente e 2 vezes em água deionizada. Logo após, realizou-se tamponamento com 3 banhos de 5 minutos em solução de Tris pH 7,4.

As concentrações e tempos de incubação dos anticorpos primários que foram utilizados estão ilustrados na tabela 4.1. As reações para os anticorpos anti-P53, anti-MDM2 e anti-pAKT foram realizadas na máquina Dako Autostainer, enquanto para o anticorpo anti-P21^{WAF1}, manualmente.

Tabela 4.1 – Tipo, concentração, procedência, clone e tempo de incubação dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica

Soro	Tipo	[]	Procedência	Clones	Incubação
P53	Monoclonal	1:75	DAKO	DO-7	40 min
MDM2	Monoclonal	1:50	Novocastra	SMP14	40 min
pAKT	Policlonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology	Ser-473-R	40 min
P21 ^{WAF1}	Monoclonal	1:30	DAKO	SX118	18 horas

Após a incubação do anticorpo primário, seguiu-se ao tamponamento com 2 banhos em TRIS pH 7,4 e incubação com o kit Envision (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos. Em seguida foi feita lavagem em TBST pH 7,6 (2 banhos). Para revelação, utilizou-se o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St Louis, MO/USA). Posteriormente à lavagem, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer. Depois, todos os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafanizados em 3

banhos de xilol e montados em resina Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA), para exame ao microscópio de luz.

Cortes de osteossarcoma foram utilizados como controle positivo para a expressão de MDM2 (DONG et al., 2003; LONGHI et al., 2001). Já para as proteínas P53, P21^{WAF1} e pAKT utilizou-se carcinoma epidermóide de boca (AMORNPHIMOLTHAN et al., 2004; LEHMAN et al., 1993; NEMES; NEMES; MARTON, 2005). Como controles negativos da reação imunoistoquímica foram utilizados os mesmos casos supracitados, que foram submetidos à reação sem a incubação do anticorpo primário. Como controle da expressão basal dessas proteínas em glândulas salivares foram utilizados 3 glândulas salivares normais.

A análise semi-quantitativa das proteínas estudadas foi executada por um único observador, sendo consideradas positivas as células que apresentavam marcação nuclear e/ou citoplasmática de coloração acastanhada. Em cada caso estudado, foram contadas 500 células por campo escolhido aleatoriamente com auxílio de um retículo acoplado a microscópio de luz com aumento final de 400x, segundo estudo prévio (ETGES et al., 2004).

A análise estatística foi realizada através do método de Mann-Whitney utilizando um nível de significância de 5%, com a finalidade de se comparar o número de células positivas das proteínas estudadas nas lesões neoplásicas e nas glândulas salivares normais.

4.3 Cultivo Celular

Para as reações de imunofluorescência e western blotting foram utilizadas linhagens celulares derivadas de: carcinoma adenóide cístico (Cac2) e adenocarcinoma não-específico (HSG) (Tabela 4.2). A linhagem Cac2 foi previamente estabelecida no Laboratório de cultivo celular da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e a linhagem HSG foi gentilmente cedida pelo professor David M. Williams do “ST Bartholomew’s and The Royal London School of Medicine and Dentistry – UK”. Ela é proveniente de células de glândula salivar humana normal submetidas à radiação ionizante, o que resultou em mutação do gene p53 (SHIRASUNA; SATO; MIYAKI, 1981).

Tabela 4.2 - Relação das linhagens de neoplasias de glândula salivar que foram utilizadas no estudo com sua respectiva origem

Linhagem	Neoplasia	Glândula De Origem
CAC2	Carcinoma adenóide cístico	Parótida
HSG	Adenocarcinoma não-específico	Submandibular

Todos os procedimentos do cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar seguindo-se os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura utilizados. As células foram descongeladas em banho Maria a 37° C por 2 minutos e transferidas para placas de Petri de 75 cm², contendo 15 ml de DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO - USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução

antibiótica-antimicótica (Sigma) e mantidas em estufa à temperatura de 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. Após as células aderirem, o meio de cultura foi trocado, isto ocorrendo sempre dentro de um período máximo de 24 horas, para que os efeitos citotóxicos do di-metil sulfóxido (DMSO-Sigma) não produzissem qualquer alteração nas células. O crescimento das células foi monitorado em microscópio de fase invertida, e o meio de cultura trocado sempre de acordo com o metabolismo celular. O método visual foi utilizado para verificar a necessidade da troca do meio de cultivo com a utilização de microscópio invertido de fase (Zeiss - Axiovert 25- Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha) e aspectos como: vitalidade celular, coloração e aspecto do meio foram analisados.

Após atingirem sub-confluência (75% da placa), as células foram subcultivadas de acordo com a necessidade de novas placas. O meio de cultura foi removido, as placas com a monocamada celular lavadas com PBS, sem cálcio e magnésio, pH 7,2 e, então, separadas com 2 ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA 1mM (Sigma) durante alguns minutos, dependendo do tipo celular a 37° C. Meio de cultura contendo soro fetal bovino foi utilizado para inativar a enzima e as células em suspensão foram centrifugadas a 300 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente. Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspenso em meio de cultura fresco e alíquotas distribuídas em novas placas para novo crescimento celular. Cada procedimento de subcultura deu origem a uma nova passagem de células e durante todo o experimento, amostras representativas foram congeladas em nitrogênio líquido para manutenção do banco de células.

4.4 Imunofluorescência

As linhagens HSG e Cac2 foram submetidas à reação de imunofluorescência para os anticorpos contra as proteínas MDM2, P53, pAKT e P21^{WAF1}.

Para esta técnica, células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro e até o momento da reação, cuidadas da maneira descrita anteriormente. Para uma melhor visualização e clareza da reação, não foi permitida a confluência celular.

No momento da reação, as lamínulas de vidro foram lavadas 3 vezes com PBS e, em seguida, fixadas com metanol absoluto por 6 minutos a -20°C e, então, lavadas 5 vezes em PBS.

Após as lavagens, as lamínulas seguiram para a fase de bloqueio, onde foram incubadas em solução de PBS 1x + BSA a 1% de forma que a superfície onde foram plaqueadas as células permanecesse imersa por 30 minutos. Após esse período, procedeu-se a quatro novas lavagens em PBS.

Os anticorpos primários foram diluídos em PBS + BSA a 1% nas concentrações e tempo de incubação descritos na Tabela 4.3. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas novamente com PBS.

Tabela 4.3 – Tipo, concentrações, clones, procedência e tempo de incubação dos anticorpos utilizados na Imunofluorescência

Soro	Tipo	[]	Procedência	Clones	Incubação
P53	Monoclonal	1:40	Santa Cruz Biotechnology	DO-7	60 minutos

Continua...

Continuação...

<i>MDM2</i>	<i>Monoclonal</i>	<i>1:25</i>	<i>Santa-Cruz Biotechnology</i>	<i>SMP14</i>	<i>60 minutos</i>
pAKT	Policlonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology	Ser 473-R	60 minutos
P21 ^{WAF1}	Monoclonal	1:40	DAKO	SX118	60 minutos

Após tal lavagem, o anticorpo secundário conjugado com fluoresceína (NOVOCASTRA Laboratories Ltda – UK) foi utilizado na concentração de 1:150 por 45 minutos, sendo que a reação ocorreu em temperatura ambiente e em câmara escura. As lamínulas foram, então, lavadas 4 vezes em PBS.

Em seguida, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro previamente limpas, utilizando-se solução de VectaShield com DAPI (Vector Laboratories, Ind.Burlingame, CA 94010) objetivando visualização do núcleo das células de forma que mesmo as células negativas pudessem ser evidenciadas.

Como controle negativo da reação, amostras foram tratadas como descrito acima, porém com omissão do anticorpo primário.

O material foi protegido da luz até o momento da visualização em microscópio invertido de fase. A documentação foi realizada por captura fotográfica das imagens em câmera acoplada a microscópio (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

As proteínas estudadas foram analisadas em relação à presença de marcação e à localização da marcação.

4.5 Western Blotting

Para a análise protéica quantitativa, foi realizada a extração das proteínas das células cultivadas. Após a sub-confluência (70% da área cultivável), o meio foi removido e as células, lavadas 2 vezes com PBSA a frio e colocadas sobre o gelo (4°C). Foi adicionado 0,5 ml/placa de tampão RIPA+ (10 mol/L Tris HCl pH 7,5; 1% de desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2µg/ml aprotinina, 2µg/ml pepstatina, 1Mm PMSF) e as células foram incubadas por 10 minutos a 4°C e sob agitação. As placas foram raspadas e o lisado, então, centrifugado a 15.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi aliquotado e estocado a -80 °C.

As proteínas do lisado foram quantificadas através do método do ácido biocinconinico BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA) que tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre resultando na redução do mesmo, com a formação de um complexo de peptídeos com o cátion cuproso. Por sua vez, o ácido biocinconinico reage com o cátion cuproso, formando o complexo BCA-Cu⁺, produzindo uma cor púrpura que é lida no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 562 nm. Ou seja, quanto mais intensa for a cor púrpura, ocorrerá mais absorção de luz, significando maior quantidade de proteína.

As amostras foram, então, analisadas por Western-Blotting, que será descrito a seguir.

A mesma quantidade de proteína total (20 µg) foi utilizada para os grupos estudados, o que permitiu posterior análise da porcentagem em que cada proteína

de interesse se apresentou nessas proteínas totais. As alíquotas previamente quantificadas foram fervidas por 5 minutos com tampão de amostra para a denaturação das proteínas (sample buffer), contendo 3% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150 mM tris pH 6,8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol.

Em seguida, foram aplicadas 20 µg de proteína por canaleta, que foram empilhadas em gel de empilhamento (preparado com 0,15M tris, 40% bis-acrilamida, 10% SDS, 20% persulfato de amônia e TEMED), separadas em gel de poliacrilamida 8, 10 ou 12% de acordo com o peso molecular da proteína estudada (Tabela 4.4). Em seguida, foi realizada eletroforese a 100 V durante 3 horas. Foi utilizado o Kaleidoscope (BioRad, Hercules, Califórnia, USA) como padrão de peso molecular.

Tabela 4.4 – Composição do gel de acrilamida a 10% com SDS (10X16 cm)

	<i>Gel de separação</i>	<i>Gel de empilhamento</i>
	10% (para 10ml)	5% (para 5ml)
Água	4 ml	3,4 ml
Acrilamida/bisacrilamida	3,3 ml	0,85 ml
Separating buffer	2,5 ml	-
Stacking buffer 4X	-	0,625 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,05 ml
Persulfato de amônia	0,1 ml	0,05 ml
Temed	0,004 ml	0,005 ml

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada por eletro-transferência úmida em aparelho especial (Hoefer miniVE, Amersham (Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), com utilização do tampão de transferência (48 mM Tris-Base; 39 mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) como recomendado pelo fabricante. Foi utilizada uma voltagem de 30 mA por 120 minutos. Após a transferência, a membrana foi submetida a fase de bloqueio dos sítios inespecíficos.

Para os anticorpos MDM2, P53 e P21^{WAF1}, o bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado utilizando-se 5% de leite em pó desnatado em TBST por 2 horas à temperatura ambiente e sob agitação ou overnight em geladeira. No caso do anticorpo pAkt, foi utilizado BSA 1% em TBST, devido à interferência que proteínas do leite podem exercer em sítios de ligação para proteínas fosforiladas.

Em seguida, o anti-soro de interesse (MDM2, P53, P21 ou pAkt) diluído na solução de bloqueio utilizada foi incubado durante 60 minutos em temperatura ambiente sob agitação (Tabela 4.5). Após o período de incubação, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos com TBST para remoção do anticorpo não absorvido, sob agitação e à temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi então aplicado por 1 hora e depois a membrana foi lavada 2 vezes com TBST por cinco minutos cada e 2 vezes com PBS 1x.

Tabela 4.5 - Relação dos anticorpos que foram utilizados no Western Blotting.

Soro	Tipo	[]	Procedência	Clones	Incubação
P53	Monoclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology	DO-7	60 minutos
MDM2	Monoclonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology	SMP14	60 minutos
pAKT	Policlonal	1:250	Santa Cruz Biotechnology	Ser 473-R	60 minutos
P21 ^{WAF1}	Monoclonal	1:250	DAKO	SX 118	60 minutos

A revelação da reação foi feita pelo método colorimétrico, com a utilização do kit Opti 4CN (Bio-Rad). Uma parte do diluente concentrado Opti-4CN foi adicionada a nove partes de água deionizada. Foram utilizados 0,25 ml para cada cm² da membrana. Para cada 10 ml do diluente preparado adicionou-se 0,2 ml de substrato Opti-4CN, misturando-se bem e colocando sobre a membrana. A membrana foi incubada no substrato por até 30 minutos, depois lavada em água deionizada por 15 minutos, assim estava pronta para documentação fotográfica. Esta reação produz uma coloração enegrecida nas bandas positivas para o anticorpo primário de interesse.

Como controles positivos para as reações foram utilizadas as linhagens SJS1 (osteossarcoma) para a proteína MDM2, Hacat (queratinócito com P53 mutante) para a P53 e HN31 (carcinoma epidermóide de boca) para os anticorpos P21 e pAKT.

As imagens foram adquiridas por um escaneador de imagens e as bandas das proteínas das amostras e controles foram comparadas (em função dos pixels e

da área da banda) utilizando-se o “software” IMAGE J 1.33u (programa de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband NIMH, NIH, USA). Os resultados foram apresentados em forma de gráfico, mostrando o valor que cada banda ocupa em relação à área selecionada.

Para a análise estatística, os valores obtidos da análise densitométrica foram avaliados através do programa BioEstat 3.0. Os valores em triplicata foram analisados através dos testes t de Student ou Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

Para um melhor entendimento, os resultados foram divididos em 3 partes:

- Expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT;
- Expressão quantitativa das proteínas através da técnica do western blotting;
- Expressão e localização das proteínas através da técnica da imunofluorescência.

5.1 Imunoistoquímica

Foi realizado o estudo da expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT em casos originados de 10 carcinomas adenóides císticos e de 3 adenocarcinomas não-específicos que foram comparados a 3 casos de glândulas salivares normais, utilizados como controle da expressão basal dessas proteínas.

As glândulas salivares normais estudadas não exibiram expressão das proteínas P53, MDM2, P21 e pAKT (Tabela 5.1).

A maioria dos CAC avaliados exibiram expressiva marcação para a proteína MDM2, variando de 21% a 83,6% (Tabela 5.1 e Figuras 5.1 e 5.2). Todos os casos de adenocarcinomas não-específicos expressaram essa proteína, com variação de 63,6% a 96%. Essa proteína pôde ser observada tanto no núcleo como no citoplasma das células analisadas, sendo que no grupo dos adenocarcinomas não-específicos a marcação citoplasmática mostrou-se mais evidente.

Comparando-se o grupo das glândulas salivares normais com os CAC e adenocarcinomas não-específicos, foi evidenciada uma maior expressão da proteína MDM2 nos grupos das neoplasias ($p = 0,0225$ e $0,0495$, respectivamente) (Tabelas 5.2 e 5.3). Os testes estatísticos revelaram, ainda, uma marcação maior para a proteína MDM2 nos carcinomas adenóides císticos sólidos em relação aos CAC cribriformes ($p = 0,0881$) (Tabela 5.4).

A proteína P53, por sua vez, exibiu expressão variável entre os diferentes carcinomas adenóides císticos analisados. Dos 10 casos estudados, 4 apresentaram positividade para essa proteína que variou de 2,01% a 37,40%. Já nos adenocarcinomas não-específicos, observou-se expressão positiva da proteína P53 nos 3 casos estudados, sendo que a porcentagem de marcação deste anticorpo encontrava-se entre 1,32% a 66,30%, com média de 28,87%. A expressão dessa proteína foi observada sempre no núcleo das células analisadas (Tabela 5.1, Figuras 5.1 e 5.2).

Não houve diferença de expressão da proteína P53 comparando-se os CAC e as glândulas normais ($p = 0,2579$). Por sua vez, o grupo dos adenocarcinomas não-específicos evidenciou maior marcação para essa proteína que as glândulas salivares normais ($p = 0,0339$) (Tabelas 5.2 e 5.3).

Os carcinomas adenóides císticos cribriformes apresentaram o mesmo padrão de marcação dos carcinomas adenóides císticos sólidos para a proteína P53, com $p = 0,7491$ (Tabela 5.4).

Foi observada ausência de marcação para a proteína P21 nos 3 grupos estudados, como pode ser observado na Tabela 5.1.

Com relação à proteína pAKT, verificou-se expressão dessa proteína em todos os casos de carcinomas adenóides císticos analisados, sendo que a marcação

variou entre 1,6% a 89,2%. O grupo dos adenocarcinomas não-específicos apresentou expressão dessa proteína nos 3 casos avaliados, que variou de 78,2% a 100%. Observou-se expressão dessa proteína predominantemente no núcleo tanto no CAC quanto nos adenocarcinomas não-específicos, apesar de algumas células exibirem marcação citoplasmática (Tabela 5.1 e Figuras 5.1 e 5.2).

Houve diferença na expressão da proteína pAKT quando comparados os grupos de adenocarcinomas não-específicos com o de glândulas salivares normais ($p= 0,0495$), o que não foi verificado quando se correlacionou o grupo dos carcinomas adenóides císticos com o das glândulas salivares normais ($p= 0,0759$) (Tabelas 5.2 e 5.3).

O grupo dos carcinomas adenóides císticos sólidos apresentou marcação mais expressiva para a proteína pAKT que o grupo dos CAC cribriformes, com $p = 0,0190$ (Tabela 5.4)

Tabela 5.1 - Dados referentes ao tipo do tumor, localização, porcentagem da expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT nos casos de carcinoma adenóide cístico, adenocarcinoma não-específico e glândula salivar normal

Caso	Tipo de Tumor	Localização	MDM2 (%)	P53 (%)	P21 (%)	pAKT (%)
01	CAC cribriforme	Língua	65,6	2,01	0	31,8
02	CAC sólido	Assoalho	77,4	0	0	54,4
03	CAC sólido	Comissura labial	67,6	37,4	0	62,8
04	CAC cribriforme	Lábio	21	0	0	14,20
05	CAC cribriforme	Maxila	0	0	0	1,6

Continua...

Continuação...

06	CAC sólido	Sublingual	47,4	0	0	47,8
07	CAC cribriforme	Parótida	76	11,97	0	20,2
08	CAC cribriforme	Maxila	57,4	2,35	0	52,6
09	CAC sólido	Maxila	83,6	0	0	89,2
10	CAC cribriforme	Lábio	21,4	0	0	44,2
11	Adenocarcinoma	Assoalho	71,2	1,32	0	78,2
12	Adenocarcinoma	Mucosa	96	66,3	0	100
		jugal				
13	Adenocarcinoma	Lábio inferior	63,6	19	0	100
14	Glândula normal	Lábio inferior	0	0	0	0
15	Glândula normal	Lábio inferior	0	0	0	0
16	Glândula normal	Lábio inferior	0	0	0	0

Tabela 5.2 – Análise comparativa da expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT entre carcinomas adenóides císticos e glândulas salivares normais

Variáveis	Categorias	Carcinoma	Glândula normal	p*
		adenóide cístico		
MDM2	Min-Máx	0-418	0	0,0225
	Mediana	307,5	0	
	Média ± dp	258,7 ± 142,39	0	
P53	Min-Máx	0-187	0	0,2579
	Mediana	0	0	
	Média ± dp	26,7 ± 59,2	0	
P21	Min-Máx	0 – 0	0	
	Mediana	0	0	
	Média ± dp	0	0	
pAKT	Min-Máx	8 – 446	0	0,0112
	Mediana	230	0	
	Média ± dp	209,4 ± 128,55	0	

dp = desvio padrão; * valor de p obtido pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela 5.3 – Análise comparativa da expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT entre adenocarcinomas não-específicos e glândulas salivares normais

Variáveis	Categorias	Adenocarcinoma	Glândula normal	p*
MDM2	Min-Máx	318-480	0	0,0495
	Mediana	356	0	
	Média ± dp	384,66 ± 84,71	0	
P53	Min-Máx	6 – 331	0	0.0339
	Mediana	95	0	
	Média ± dp	144 ± 167,9	0	
P21	Min-Máx	0 – 0	0	
	Mediana	0	0	
	Média ± dp	0	0	
pAKT	Min-Máx	391 – 500	0	0,0495
	Mediana	500	0	
	Média ± dp	463,66 ± 62,93	0	

dp = desvio padrão; * valor de p obtido pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela 5.4 – Análise comparativa da expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT entre carcinomas adenóides císticos sólidos e cribriformes

Variáveis	Categorias	CAC sólido	CAC cribriforme	p*
MDM2	Min-Máx	47-83	0-76	0,0881
	Mediana	72	39	
	Média ± dp	68,5 ± 15,77	40 ± 30,10	
P53	Min-Máx	0-37,4	0-11	0,7491
	Mediana	0	1	
	Média ± dp	12,46 ± 24,94	2,5 ± 4,27	
P21	Min-Máx	0	0	
	Mediana	0	0	
	Média ± dp	0	0	
pAKT	Min-Máx	47 – 89	1 – 52	0,0190
	Mediana	58	25,5	
	Média ± dp	63 ± 18,38	27 ± 19,09	

dp = desvio padrão; * valor de p obtido pelo teste U de Mann-Whitney

Figura 5.1 – Carcinoma adenóide cístico: HE e expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, pAKT e P21 (aumento original = 400x)

Figura 5.2 – Adenocarcinoma não específico: HE e expressão imunoistoquímica das proteínas MDM2, P53, pAKT e P21 (aumento original = 400x)

5.2 Western Blotting

A técnica do Western Blotting foi realizada no intuito de se avaliar quantitativamente a expressão das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT nas linhagens celulares Cac2 (derivada de carcinoma adenóide cístico) e HSG (adenocarcinoma não-específico), comparando os resultados com as linhagens controle positivas SJSA1 (derivada de osteossarcoma), Hcat (derivada de queratinócitos imortalizados) e HN31 (derivada de carcinoma epidermóide). Para verificar se a quantidade de proteína carregada no gel estava correta, a proteína β -actina foi utilizada como controle das reações. Os resultados obtidos podem ser analisados nas Figuras 5.3 e 5.4.

Foi observado que tanto a linhagem Cac2 quanto a HSG exibiram expressão positiva para a proteína MDM2. A expressão foi semelhante à da linhagem controle utilizada (SJSA1), proveniente de osteossarcoma que segundo estudos prévios (DONG et al., 2003; LONGHI et al., 2001), apresenta superexpressão da proteína MDM2. A análise estatística, através do teste t de Student, comparando os resultados das linhagens de neoplasias de glândulas salivares estudadas com a linhagem controle, mostrou que não existem diferenças estatisticamente significantes entre a expressão da proteína MDM2 nas linhagens Cac2 e SJSA1 ($p=0,3219$) nem nas linhagens HSG e SJSA1 ($p=0,0406$), portanto pode-se afirmar que existe superexpressão da proteína MDM2 nas linhagens Cac2 e HSG (Figura 5.3 e 5.4).

A linhagem HSG é constituída por células epitelióides, provenientes de uma glândula submandibular submetida à radiação ionizante, o que ocasionou o

desenvolvimento de uma neoplasia que mostra mutação do gene p53 (SHIRASUNA; SATO; MIYAZAKI, 1981). Os resultados obtidos pela técnica de western blotting para a proteína P53 estão de acordo com a literatura, apontando para a mutação de p53 com expressão dessa proteína maior até mesmo que no controle positivo utilizado. A linhagem Cac2 não exibiu expressão da proteína P53 (Figuras 5.3 e 5.4).

Não foi observada expressão da proteína P21 nas linhagens Cac2 e HSG (Figuras 5.3 e 5.4).

A expressão de pAKT foi observada em ambas as linhagens estudadas, sendo que na linhagem Cac2 a expressão observada foi superior à da linhagem HSG. A linhagem controle positivo utilizada, a HN31, derivada de carcinoma epidermóide de boca, apresentou expressão superior às das neoplasias de glândula salivar avaliadas. A análise estatística realizada através do teste t de Student mostrou expressão de pAKT semelhante entre as linhagens Cac2 e HN31 ($p=0,2562$) e entre as linhagens HSG e HN31 ($p=0,0679$), o que nos permite afirmar que as linhagens Cac2 e HSG apresentam superexpressão da proteína pAKT (Figuras 5.3 e 5.4).

Figura 5.3 - Representação gráfica da média de valores da quantificação das proteínas MDM2,, P53, P21, pAkt e seus respectivos controles

Figura 5.4 - Resultados quantitativos em western blotting relativos à expressão das proteínas MDM2, P53, P21, pAKT e β -actina nas linhagens Cac2, HSG e controles

5.3 Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência tiveram por objetivo esclarecer a localização intracelular das proteínas-alvo deste estudo. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 5.5 e nas Figuras 5.5 e 5.6.

Foi verificada expressão positiva para a proteína MDM2 nas linhagens Cac2 e HSG em todas as células, tanto no núcleo, quanto no citoplasma, porém a marcação nuclear mostrou-se bem mais intensa que a citoplasmática.

A linhagem HSG mostrou positividade nuclear e citoplasmática (bem tênue) para a proteína P53, enquanto a linhagem Cac2 não exibiu expressão dessa proteína.

As 2 linhagens estudadas foram negativas para a proteína P21, ao mesmo tempo em que foram positivas para a proteína pAKT, que pôde ser observada tanto no núcleo quanto no citoplasma celular de todas as células, com expressão nuclear mais evidente.

Tabela 5.5 - Expressão e localização celular das proteínas MDM2, P53, P21 e pAKT nas linhagens Cac 2 e HSG

<i>Linhagem</i>	<i>MDM2</i>	<i>P53</i>	<i>P21</i>	<i>pAKT</i>
Cac2	+ NC	-	-	+ NC
HSG	+ NC	+ NC	-	+ NC

Reação positiva (+); reação negativa (-); localização nuclear (N); localização citoplasmática (C)

Figura 5.5 – Expressão das proteínas MDM2 e pAKT na linhagem Cac2

Figura 5.6 – Expressão das proteínas P53, MDM2 e pAKT na linhagem HSG

6 DISCUSSÃO

A regulação do ciclo celular é um processo complexo que envolve uma rede de proteínas interagindo, sendo que o desequilíbrio desse circuito pode levar à proliferação celular descontrolada. O equilíbrio entre os genes supressores de tumor e os oncogenes é responsável pela homeostase celular e muitos dos eventos moleculares que ativam ou inativam genes regulatórios são ainda desconhecidos.

A literatura mostra a ocorrência de mutações no gene p53 em cerca de metade dos cânceres em humanos, o que faz deste gene e sua proteína alvos importantes quando se pretende desvendar os mecanismos envolvidos na carcinogênese e progressão das mais diversas neoplasias (MICHAEL; OREN, 2002).

Contudo, também tem se tornado claro que, na grande maioria dos casos que expressam a proteína P53 selvagem, a função dessa proteína pode estar severamente comprometida (MICHAEL; OREN, 2002). Isto pode ocorrer por diversos motivos, dentre eles o aumento da expressão e atividade dos seus reguladores negativos como o mdm2, bem como pela perda de função de fatores capazes de promover direta ou indiretamente a ativação da P53 (MICHAEL; OREN, 2002).

Em estudo prévio realizado em nossa disciplina (MANTESSO et al., 2004), observou-se superexpressão de mRNA do gene mdm2 em neoplasias de glândulas salivares, indicando a participação do mdm2 na formação e/ou progressão desses tumores. Os autores sugeriram que novos estudos fossem realizados no intuito de se analisar a expressão da proteína MDM2 nessas neoplasias, pois o aumento da

expressão do mRNA não necessariamente significava que a quantidade de proteína estava aumentada.

Nesse sentido, embora a proteína MDM2 possa estar sendo traduzida em quantidade correspondente aos níveis elevados de RNA mensageiro, pode haver aumento da sua degradação limitando, portanto, sua quantidade. Além disso, pode também ocorrer a não tradução da quantidade exacerbada de RNA mensageiro em proteína e, nesse caso, os níveis elevados de RNA mensageiro também não correspondem a níveis elevados de proteína. Por outro lado, a baixa expressão de RNA mensageiro de mdm2, também não significa que haverá baixa quantidade de proteína, visto que pode haver perda do controle na tradução protéica, e nesse caso, uma pequena quantidade de RNA pode ser ininterruptamente traduzido, gerando uma quantidade excessiva de proteína.

Diante dessa evidência, tornou-se imperativo o estudo de MDM2 em nível protéico, assim como o estudo de outras proteínas que apresentam relação direta ou indireta com a mesma, a saber: P53, P21^{WAF1} e pAKT. Essas proteínas, por meio do equilíbrio entre si, mantêm o balanço entre morte e proliferação celular. Portanto, esse estudo foi realizado no intuito de contribuir, pelo menos em parte, no entendimento da oncogênese de algumas neoplasias malignas de glândulas salivares.

Nesse sentido, utilizou-se a técnica de imunoistoquímica para avaliação da expressão das proteínas supra-citadas. Porém, sendo esta uma técnica qualitativa e sabendo-se que os níveis das proteínas objeto desse estudo são importantes na regulação de sua função, tornou-se necessária, também, a análise quantitativa que foi realizada através do método do western blotting. Para finalizar, a localização intra-celular das proteínas em questão é de fundamental importância para o

entendimento de sua atividade funcional e foi, portanto, analisada através da técnica da imunofluorescência.

Dessa forma, também foi possível avaliar a expressão das proteínas estudadas em ambientes diferentes. Pela técnica de imunoistoquímica, os tumores representam o retrato do que ocorre no paciente, onde existem todos os componentes do estroma e parênquima tumoral interagindo. Na análise por western blotting e imunofluorescência, o estudo deu-se diretamente em células neoplásicas em cultivo, onde os componentes da matriz extracelular e a interação com outros tecidos não existem, permitindo a avaliação de expressão protéica em nível basal.

Até agora, existem poucos estudos sobre a expressão da proteína MDM2 em tumores de glândulas salivares.

Os resultados imunoistoquímicos deste estudo mostraram uma significativa expressão da proteína MDM2 nas lesões de CAC e ANE avaliadas, corroborando com os achados de Araújo et al. (2000a), Dorta (2003) e Jia et al. (2004) que mostraram expressiva marcação para essa proteína em neoplasias malignas de glândulas salivares. Além disso, observou-se ausência de expressão para a proteína MDM2 nas glândulas salivares normais.

Os estudos mostram que a proteína MDM2 é fracamente expressa em células normais (COHEN; HAUPT; HAUPT, 2005) e que o acúmulo nuclear da proteína MDM2 é um importante mecanismo tumorigênico que leva ao bloqueio das funções regulatórias da proteína P53 (SCHLOTT et al., 2001). Os resultados do presente estudo estão de acordo com Schlott et al. (2001) e com Cohen, Haupt e Haupt (2005), uma vez que foi observada superexpressão de MDM2 nos tumores estudados localizada predominantemente no núcleo das células, também foi observada a ausência de expressão dessa proteína nas glândulas salivares normais.

Alguns estudos mostram que, em geral, a superexpressão de MDM2 está associada a um pior prognóstico e a estágios avançados da doença. Por outro lado, expressão elevada dessa proteína em melanomas e carcinomas de mama foi associada a prognóstico favorável (McCANN et al., 1995; POLSKY et al., 2002; QUESNEL et al., 1994). Portanto a utilização da MDM2 como marcador prognóstico deve ser considerada com cautela, pois é dependente do tipo de neoplasia avaliada.

Não foi objetivo deste estudo avaliar a utilização da proteína MDM2 como marcador de prognóstico, porém um fato interessante que foi observado e merece nota é que os carcinomas adenóides císticos sólidos mostraram maior expressão da proteína MDM2 que os CAC cribriformes ($p=0,0881$), o que aponta para a sugestão que a proteína MDM2 pode ser indicativa de pior prognóstico nessas lesões, visto que o CAC sólido é sabidamente mais agressivo que o CAC cribriforme (BARNES et al., 2005).

Analisando-se os resultados do western blotting, observou-se que as linhagens Cac2 e HSG apresentaram expressão da proteína MDM2 semelhante à da linhagem controle utilizada, a SJSA1, que sabidamente apresenta superexpressão dessa proteína ($p=0,3219$ e $0,0506$, respectivamente) (DONG et al., 2003; LONGHI et al., 2001). Portanto, podemos afirmar que, no presente estudo, a proteína MDM2 mostrou-se superexpressa nas linhagens CAC2 e HSG, corroborando com estudos prévios (ARAÚJO et al., 2000a; MANTESSO et al., 2004).

Mantesso et al. (2004) observaram baixa superexpressão do mRNA do gene *mdm2* na linhagem Cac2 e, contrariamente, o presente estudo mostrou superexpressão da proteína MDM2 em níveis semelhantes ao controle positivo (SJSA1) nessa linhagem. Esse fato pode ser explicado com base na sugestão de que o mRNA presente deve estar traduzindo excessivamente, resultando em maior

expressão da proteína. Schlott et al. (2001) também não encontraram correlação entre a quantidade de mRNA e da proteína MDM2 quando estudaram neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.

Avaliando-se os resultados da imunofluorescência e da imunoistoquímica, observou-se imunorreatividade para a MDM2 nas linhagens Cac2 e HSG predominantemente no núcleo, com uma fraca marcação citoplasmática, resultado este em acordo com os estudos de Dorta (2003) e de Jia et al. (2004). A marcação citoplasmática, mesmo que tênue confirma que essa proteína se desloca do núcleo para o citoplasma, fato essencial para a habilidade do MDM2 em regular os níveis de P53, levando-a ao citoplasma, onde sofre degradação proteossômica. Diante desse fato, podemos supor que a ausência de P53 na linhagem Cac2 encontrada nesse estudo deve-se, ao menos em parte, à sua degradação mediada pela MDM2.

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de se relacionar a expressão da proteína P53 com o prognóstico de lesões de glândula salivar. Porém esses estudos são controversos, alguns encontraram uma associação positiva entre a imunoexpressão dessa proteína e o prognóstico dos pacientes (GALLO et al., 1995; ZHU; WHITE; TIPOE, 1997; JIA et al., 2004), enquanto Karja et al. (1997) não encontraram essa relação. Além disso, alguns estudos mostraram uma associação entre mutações do gene p53 e expressão da proteína, enquanto outros concluíram que essa relação não existe.

Os resultados da análise imunoistoquímica do presente estudo para o carcinoma adenóide cístico diferem parcialmente dos resultados da análise da linhagem Cac2 por imunofluorescência e western blotting, pois mostram expressão de P53 em carcinomas adenóide císticos somente em alguns casos e em níveis bastante variados (de 2,01 a 37,40%). Esse padrão de expressão variável e

ocasional já foi abordado na literatura pertinente e, ao menos em parte, pode ser responsável pela divergência dos resultados publicados até o momento em relação à expressão de P53 em carcinomas adenóides císticos. De um modo geral, a expressão observada para a proteína P53 nos tumores estudados está de acordo com a maioria dos estudos na literatura, que mostram uma expressão ocasional e variável ou nula de P53 em carcinomas adenóides císticos. (DODD; SLEVIN, 2006; PAPADAKI et al., 1996; PEREZ et al., 2006 QUEIROZ, 1997).

É importante lembrar que no ambiente retratado na imunoistoquímica, onde existem interações entre as células neoplásicas e os mais diversos componentes, sinais reguladores de proliferação ou comportamento celular estão sendo constantemente liberados, tornando o local em que as células neoplásicas se encontram, bastante variado, o que corresponde aos resultados encontrados na análise imunoistoquímica.

Ao mesmo tempo, podemos sugerir que no caso da linhagem Cac2, avaliada por imunofluorescência e western blotting pode-se estar diante da proteína P53 selvagem que não se acumula por ter uma meia vida curta e, possivelmente, está sendo inativada e levada para a degradação pela proteína MDM2, que por sua vez, aparece superexpressa. Já a variação encontrada na imunoistoquímica pode refletir casos de proteína P53 selvagem não passível de detecção e casos de proteína mutante que se acumula no núcleo, sendo passível de detecção.

Avaliando-se os resultados dos adenocarcinomas não-específicos e da linhagem HSG, pôde-se observar que essa lesão expressou a proteína P53 nas 3 técnicas de avaliação utilizadas: imunoistoquímica, western blotting e imunofluorescência. Estes resultados estão de acordo com Affolter et al. (2005) que

mostraram expressão imunoistoquímica dessa proteína em todos os adenocarcinomas não específicos avaliados.

Esses resultados obtidos corroboram com a literatura prévia a respeito dessa linhagem celular (SHIRASUNA; SATO; MIYAKI, 1981), pois existe um acúmulo nuclear intenso de P53, o que, nesse caso, sabidamente corresponde à mutação no gene. Estes resultados estão, ainda, concordantes com Mantesso et al. (2004).

As glândulas salivares não neoplásicas não exibiram marcação imunoistoquímica para a proteína P53, sendo que quando comparados os valores de células positivas nos carcinomas adenóides císticos e nas glândulas salivares não neoplásicas, observou-se que os valores foram semelhantes ($p=0,2579$). Já quando avaliada a expressão dessa proteína no grupo dos adenocarcinomas, em comparação com as glândulas normais, pôde-se observar que os adenocarcinomas apresentaram uma maior expressão da proteína P53 ($p = 0,0339$).

Pode-se sugerir um comprometimento importante na regulação da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, permitindo atribuir às alterações na proteína P53 um papel importante no desenvolvimento do adenocarcinoma não-específico, ainda que outros componentes possam contribuir ou interagir com este processo, como será discutido subsequentemente.

Considerando-se a sabida mutação de p53 na linhagem HSG, a quantidade excessiva de MDM2 encontrada pode ser explicada, uma vez que a MDM2 é capaz de formar complexo também com a forma mutante de P53 facilitando, portanto, a detecção de MDM2 pelas técnicas de imunoistoquímica e imunofluorescência.

É importante salientar que segundo Mantesso et al. (2004), o mRNA de mdm2 na linhagem HSG não se encontra superexpresso, o que sinaliza no nível protéico,

para estabilização do complexo formado por essas proteínas e não para um processo dinâmico de equilíbrio entre suas quantidades.

Os blocos representativos de glândulas salivares normais não exibiram expressão da proteína P53, o que está de acordo com a literatura que afirma que, em situação de normalidade, os níveis de P53 são mantidos bem baixos devido ao feedback MDM2-P53 (MICHAEL; OREN, 2002; VOUSDEN; LU, 2002; WEBER et al, 2002).

Com relação ao p21, seu papel no desenvolvimento do câncer permanece desconhecido e é controverso. Alguns estudos sugerem que a proteína P21 está envolvida na inibição da interação entre as ciclinas e as quinases dependentes de ciclina, ligação esta indispensável para a progressão do ciclo celular (GOHRING et al., 2001; ZHANG et al., 2004). Outros trabalhos, ao contrário, têm demonstrado que a proteína P21 não inibe a ligação ciclina-cdk e sim facilita a união dessas proteínas, promovendo a translocação nuclear desse complexo e a progressão do ciclo celular (WONG et al., 2001).

Em nossa casuística, a expressão da proteína P21 foi nula, tanto entre os carcinomas adenóides císticos, como entre os adenocarcinomas não-específicos, assim como nas glândulas salivares normais nas 3 técnicas utilizadas. Esses resultados estão de acordo com a literatura (DORTA, 2003; MANTESSO et al., 2004; PAPADAKI et al., 1996).

A avaliação da proteína P21 foi realizada com o intuito inicial de sinalizar o status do P53, mas essa função para a proteína P21 em nosso estudo mostrou-se, ao menos parcialmente, ineficaz. No caso da linhagem HSG, não existe expressão da proteína P21 devido ao fato de que essa linhagem expressa a proteína P53 mutante, incapaz de ativar a proteína P21. Já na linhagem Cac2, a negatividade

para a proteína P21 pode ser explicada pela ausência de expressão da proteína P53, responsável pela ativação da proteína P21, que supostamente estaria sendo levada à degradação pela proteína MDM2.

No entanto, a expressão variável de P53 encontrada nos casos avaliados pela técnica de imunoistoquímica sinalizando, ao menos em parte, a participação de proteína P53 selvagem, apontavam para uma possível positividade para a proteína P21 em alguns casos, o que não ocorreu.

Nesse sentido, a ausência de marcação para essa proteína nessas neoplasias pode estar relacionada à expressão da proteína MDM2. Durante muito tempo, pensou-se que a atividade oncogênica da proteína MDM2 estava relacionada apenas à sua capacidade em inibir as atividades da P53. Recentemente, entretanto, foi demonstrado que a proteína MDM2 está envolvida na regulação negativa da P21. Zhang et al. (2004) mostraram que a MDM2 se liga diretamente à proteína P21, levando-a para degradação. Com base em nossos resultados, podemos sugerir que essa ligação pode estar acontecendo nas neoplasias estudadas, visto que a proteína MDM2 encontra-se expressa nas linhagens e casos estudados e, ao mesmo tempo, não foi observada expressão da proteína P21. Portanto, podemos sugerir que a inativação da P21 parece ser um outro ponto crítico da MDM2 na tumorigênese de neoplasias de glândula salivar.

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de se avaliar o valor prognóstico da expressão da proteína P21 em tumores humanos. Os resultados são controversos, uma vez que alguns trabalhos relatam que a ausência de expressão da proteína P21 está associada com pobre sobrevida (AFFOLTER et al., 2005). Ao contrário, outros estudos sugerem que a expressão da proteína P21 não está relacionada ao prognóstico (KOUREA et al., 2003). Dessa forma, estudos

subsequentes são necessários tanto para confirmar a possível interação entre MDM2 e P21, quanto para avaliar um possível valor prognóstico que esse fato acarretaria em neoplasias de glândula salivar.

A via do PI3K/Akt representa uma cascata de sinalização importantíssima na regulação de processos celulares vitais, controlando crescimento e morte celulares. Não é impressionante a grande quantidade de estudos que mostram que esta via aparece ativada em muitos tumores malignos, incluindo carcinomas colo-retais, gástricos, de próstata, de tireóide, de endométrio, de pulmão, cérebro e de mama (MAJUNDER; SELLER, 2005; RUDELIUS et al., 2006).

Apesar dos muitos estudos disponíveis sobre a expressão da proteína pAKT em neoplasias malignas, não existe nenhum relato sobre a expressão dessa proteína em neoplasias de glândulas salivares, o que torna o presente trabalho inédito.

Os resultados do presente estudo mostraram alta expressão da proteína pAKT nos casos e nas linhagens celulares estudadas.

Os estudos imunoistoquímicos mostraram alta expressão dessa proteína na maioria dos casos de carcinoma adenóide cístico e em todos os casos de adenocarcinoma não-específico estudados. As glândulas salivares normais não exibiram expressão dessa proteína, além disso, os carcinomas adenóides císticos sólidos mostraram marcação maior para a proteína pAKT que os CAC cribriformes ($p = 0,0190$), fato que sugere que essa proteína deve desempenhar um papel importante no comportamento dessas lesões.

Analisando-se os resultados quantitativos obtidos com o western blotting, observou-se que a linhagem celular Cac2 exibiu expressão da proteína pAKT semelhante à linhagem HN31 controle ($p=0,2562$). Como a linhagem HN31

sabidamente apresenta uma superexpressão dessa proteína, podemos afirmar que a linhagem Cac2 apresentou uma superexpressão de pAKT.

A linhagem HSG apresentou uma tendência a menor expressão dessa proteína que a Cac2, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,1242$), portanto a linhagem HSG também apresenta uma superexpressão dessa proteína.

Os estudos de imunofluorescência mostraram expressão da proteína pAKT nas linhagens Cac2 e HSG tanto no núcleo quanto no citoplasma celular, sendo a expressão nuclear bem mais intensa. Previamente, foi descrito que a distribuição celular do AKT é diferente entre as várias linhagens celulares, mas o mecanismo que leva a essa diferença não é conhecido (WANG; BRATTAIN, 2006).

Nossos dados são consistentes com o estudo prévio de Rudelius et al. (2006) que mostrou a ativação da via do Akt em linfomas e provou que o pAKT e o MDM2 apresentam uma relação direta e bem peculiar, sendo a expressão da proteína MDM2 dependente da expressão da pAKT. Além disso, a fosforilação da MDM2 pela AKT promove seu deslocamento nuclear, onde ela antagoniza ação da P53.

Em suma, nossos resultados sugerem que nas neoplasias malignas de glândula salivar estudadas, a via do Akt está ativa e parece acionar a MDM2, que se desloca do citoplasma para o núcleo, local onde se liga à proteína P53 e a leva ao citoplasma onde ela sofre degradação. Essa cascata de sinalizações ativada leva ao aumento da sobrevivência e da proliferação celular e à inibição da apoptose, que são eventos cruciais tanto na formação quanto na progressão de neoplasias.

A partir desse ponto, novos estudos devem ser realizados, utilizando-se, por exemplo, a co-imunoprecipitação, no intuito de se melhor entender os mecanismos relacionados à participação e interação dessas proteínas a fim de, no futuro, se

elucidar o comportamento biológico e aprimorar o tratamento das neoplasias malignas de glândula salivar.

7 CONCLUSÕES

7.1 Existe superexpressão das proteínas MDM2 e pAKT em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma não-específico;

7.2 Foi observada expressão de P53 no adenocarcinoma não-específico e expressão ocasional no carcinoma adenóide cístico;

7.3 Não foi detectada expressão de P21^{WAF1} nas neoplasias estudadas;

7.4 Os resultados do presente estudo sugerem que as proteínas pAKT e MDM2 estão envolvidas na tumorigênese e/ou progressão tumoral de carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma não específico;

REFERÊNCIAS¹

Affolter A, Helmbrecht S, Finger S, Hörmann K, Götte K. Altered expression of cell cycle regulators p21, p27, and p53 in tumors of salivary glands and paranasal sinuses. *Oncol Rep* 2005;13:1089-94.

Alves FA, Pires FR, Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP. PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours. *Oral Maxillofac Surg* 2004;33:593-7.

Amornphimalthan P, Sriuranpona 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;15(10):4029-37.

Araújo VC, Martins MT, Leite KRM, Araújo NS. Immunohistochemical Mdm2 expression in minor salivary gland tumours and its relationship to p53 status. *Oral Oncol* 2000a;36:67-9.

Araújo VC, Sousa SOM, Carvalho YR, Araújo NS. Application of Immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000b;8(3):195-02.

Araújo VC, Loyola AM, Santos Pinto D, Borra RC, Araújo NS. P53 in biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system. *Oral Oncol* 1997;33(1):5-9.

Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR. The p53 network. *J Biol Chem* 1998;273(1):1-4.

Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. 1a ed. Lyon: IARC Press, 2005. cap. 5, p.221-24.

Broll R, Stark A, Windhovel U, Best R, Strik MW, Schimmelpenning H, et al. Expression of p53 and mdm2 mRNA and protein in colorectal carcinomas. *Eur J Cancer* 1999;35(7):1083-8.

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

Carlson MA, Longaker MT, Thompson JS. Modulation of FAK, AKT and p53 by stress release of the fibroblast-populated collagen matrix. *J Surg Res* 2004;120(2):171-7.

Chau Y, Hongyo T, Aozasa K, Chan JKC. Dedifferentiation of adenoid cystic carcinoma: report of a case implicating p53 gene mutation. *Hum Pathol* 2001;32(12):1403-7.

Cheng JQ, Altomare DA, Klein MA, Lee WC, Kruh GD, Lissy NA. 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.

Cheuk W, Chan JKC, Ngan RKC. Dedifferentiation in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. An uncommon complication associated with an accelerated clinical course. *Am J Surg Pathol* 1999;23(4):465-72.

Cohen YL, Haupt S, Haupt Y. Mdm2 in growth signaling and cancer. *Growth factors* 2005;23(3):183-92.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders; 1999. cap. 8, p. 260-327.

Craanen MS, Blok P, Offerhaus GJ, Meijer GA, Dekker W, Kuipers EJ. P21Waf1/Cip1 expression and the p53/MDM2 feedback loop in gastric carcinogenesis. *J Pathol* 1999;189(4):481-6.

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

Dodd RL, Slevin NJ. Salivary gland adenoid cystic carcinoma: a review of chemotherapy and molecular therapies. *Oral Oncol* 2006;42(8):759-69.

Dong YB, Yang HL, Elliot MJ, McMasters KM. Increased mdm-2 expression in a p53-independent manner blocks UV-induced cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma cells. *Tumour Biol* 2003;24(3):130-9.

Dorta RG. Estudo da expressão imunoistoquímica das proteínas P53, P21^{WAF1/Cip1}, MDM2 e P14^{ARF} em carcinomas adenóides císticos de glândulas salivares menores, parótida e submandibular [Tese doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

Dubska L, Andera L, Sheard MA. HER2 signaling downregulation by trastuzumab and suppression of the PI3K/Akt pathway: an unexpected effect on TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* 2005;579(19):4149-58.

Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, Karmolinski A, Dworakowska R, Wirth T. Clinical significance of apoptotic index in non-small cell lung cancer: correlation with p53, mdm2, pRb and p21WAF1/CIP1 protein expression. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131(9):617-23.

Ellis GL, Auclair PL. Tumors of the salivary glands. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1996.

Etges A, Nunes FD, Ribeiro KC, Araújo VC. Immunohistochemical expression of retinoblastoma pathway proteins in normal salivary glands and in salivary gland tumours. *Oral Oncol* 2004;40(3):326-31.

Freitas LL, Araújo VC, Martins MT, Chone C, Crespo A, Altemani A. Biomarker analysis in carcinoma ex pleomorphic adenoma at an early phase of carcinomatous transformation. *Int J Surg Pathol* 2005;13(4):337-42.

Gallo O, Franchi A, Bianchi S, Boddi V, Giannelli E, Alajmo E. P53 oncoprotein expression in parotid gland carcinoma is associated with clinical outcome. *Cancer* 1995;57(8):2037-44.

Gohring UJ, Bersch A, Becker M, Neuhaus W, Schondorf T. p21waf correlates with DNA replication but not with prognosis in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 2001;4:866-70.

Jia L, Esguerra RL, Tang X, Yin H, Sakamoto K, Okada N, et al. Prognostic value of apoptosis and apoptosis-associated proteins in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Pathol Int* 2004;54:217-23.

Karja VJ, Syrjanen KJ, Kurvinen AK, Syrjanen SM. Expression and mutation of p53 in salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med* 1997;26(5):217-23.

Kishi M, Nakamura M, Nishimine M, Ikuta M, Kirita T, Konishi N. Genetic and epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. *Oral Oncol* 2005;41:161-9.

Kiyoshima T, Shima K, Kobayashi I, Matsuo K, Okamura K, Komatsu S, et al. Expression of p53 tumor suppressor gene in adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *Oral Oncol* 2001;37(3):315-22.

Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, Leelakriangsak M, Amornphimoltham P. Alterations of p53, pRb, Cyclin D1 and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2000;36(4):334-9.

Kourea HP, Koutras AK, Scopa CD, Marangos MN, Tzoracoeleftherakis E, Koukouras D, et al. Expression of the cell cycle regulatory proteins p34^{cdc2}, p21^{waf1}, and p53 in node negative invasive ductal breast carcinoma. *J Clin Pathol* 2003;56:328-35.

Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K. p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14ARF proteins in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2004;33:292-9.

Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennet WP, Welsh JA, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 1993;14(5):833-9.

Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, et al. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58(11):1199-205.

Longhi A, Benassi MS, Molendini L, Macchiagodena M, Picci P, Bacci G. Osteosarcoma in blood relatives. *Oncol Rep* 2001;8(1):131-6.

Loyola AM, Araújo VC, Sousa SOM, Araújo NS. Minor salivary gland tumours. A retrospective study of 164 cases in a brazilian population. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1995;31B(3):197-01.

Luo Y, Hurwitz J, Massague J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21. *Nature* 1995;375(6527):159-61.

Luukkaa H, Klemi P, Leivo I, Vahlberg T, Grenman R. Prognostic significance of Ki-67 and p53 as tumor markers in salivary glands malignancies in Finland: an evaluation of 212 cases. *Acta Oncol* 2006;45(6):669-75.

Majumder PK, Sellers WR. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* 2005;24:7465-74.

Mantesso A, Loducca SV, Bendit I, Garicochea B, Nunes FD, Araújo VC. Mdm2 mRNA expression in salivary gland tumour cell lines. *J Oral Pathol Med* 2004;33(2):96-101.

Martinez JC, Palomino JC, Cabello A, Sepúlveda JM, de la Camara AG, Ricoy JR. HDM2 overexpression and focal loss of p14/ARF expression may deregulate the p53 tumour suppressor pathway in meningeal haemangiopericytomas. Study by double immunofluorescence and laser scanning confocal microscopy. *Histopathol* 2005;6(2):184-94.

Mathew R, Arora S, Khanna R, Mathur M, Shukla MK, Ralhan R. Alterations in p53 and pRb pathways and their prognostic significance in esophageal cancer. *Eur J Cancer* 2002;38:832-41.

Matizonkas- Antônio LF, Mesquita RA, Souza SCOM, Nunes FD. TP53 mutations in salivary glands neoplasms. *Braz Dent J* 2005;16(2):162-6.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18(53):7621-36.

Mayo LD, Donner DB. The PTEN, MDM2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* 2002;27(9):462-7.

McCann AH, Kirley A, Carney DN, Corbally N, Magee HM, Keating G, et al. Amplification of the MDM2 gene in human breast cancer and its association with MDM2 and p53 protein status. *Br J Cancer* 1995;71(5):981-5.

Michael D, Oren M. The p53 and MDM2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12(1):53-9.

Moll UM, Schramm LM. p53 - an acrobat in tumorigenesis. *Crit Rev Oral Biol* 1998;9(1):23-37.

Momand J, Wu HA, Dasgupta G. MDM2- master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 2000;242(1-2):15-29.

Nakashima N, Kuwano K, Maeyama T, Hagimoto N, Yoshimi N, Hamada N, et al. The p-53-MDM2 association in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis and non-specific interstitial pneumonia. *J Clin Pathol* 2005;58(6):583-9.

Neely MM, Rohrer MD, Young SK. Tumours of minor salivary glands and the analysis of 106 cases. *J Okla Dent Assoc* 1996;86(4):50-2.

Nemes Ja, Nemes Z, Marton IJ. p21WAF1/CIP1 expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005;34(5):274-9.

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

Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2000;29(9):413-25.

Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, et al. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem* 2002;277(24):21843-50.

Papadaki H, Finkelstein FD, Kounelis S, Bakker A, Swalsky PA, Kapadia SB. The role of p53 mutation and protein expression in primary and recurrent adenoid cystic carcinoma. *Human Pathol* 1996;27(6):567-72.

Pellikainen MJ, Pekola TT, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, et al. P21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation and prognosis. *J Clin Pathol* 2006;56(3):214-20.

Perez DEC, Alves FA, Nishimoto IN, Almeida OP, Kowalski LP. Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol* 2006;42:139-46.

Polsky D, Melzer K, Hazan C, Panageas KS, Busam K, Drobnjak M, et al. HDM2 protein overexpression and prognosis in primary malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(23):1803-06.

Queiroz LMG. Expressão do PCNA, Ki-67, c-erb-2 e p53 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândula salivar menor [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1997.

Quesnel B, Preudhomme C, Fournier J, Fenaux P, Peyrat JP. MDM2 genes amplification in human breast cancer. *Eur J Cancer* 1994;30A(7):982-4.

Qureshi SS, Nadkarni MS, Shrikhande SV, Desai S, Deodhar K, Ramadwar M, et al. Hepatic resection for metastasis from adenoid cystic carcinoma of parotid gland. *Indian J Gastroenterol* 2005;24(1):29-30.

Reid AH, Tsai MM, Venzon DJ, Wright CF, Lack EE, O'Leary TJ. MDM2 amplification, P53 mutation, and accumulation of the P53 gene product in malignant fibrous histiocytoma. *Diagn Mol Pathol* 1996;5(1):65-73.

Röijer E, Nordkvist A, Strom AK, Ryd W, Behrendt M, Bullerdiel J, et al. Translocation, deletion/amplification, and expression of HMGIC and MDM2 in a carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Am J Pathol* 2002;160(2):433-40.

Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, Pham THT, Fend F, Jaffe ES, et al. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma. *Blood* 2006;108(5):1668-76.

Sato K, Ueda Y, Sakurai A, Ishikawa Y, Kaji S, Nojima T, et al. Adenoid cystic carcinoma of the maxillary sinus with gradual histologic transformation to high grade adenocarcinoma: a comparative report with dedifferentiated carcinoma. *Virchows Arch* 2006;448(2):204-8.

Schlott T, Nagel H, Laskawi R, Eifert H, Droese M. Genetic analysis of the human oncoprotein MDM2 in benign and malignant tumors of the salivary gland. *Pathobiology* 2001;69:67-76.

Shirasuna K, Sato M, Miyazaki T. A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* 1981;48(3):745-52.

Soini Y, Kamel D, Nuorva K, Lane DP, Vahakangas K, Paakko. Low p53 expression in salivary gland tumours compared with lung carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;421(5):415-20.

Triantafyllidou K, Dimitrakopoulos J, Iordanidis F, Koufogiannis D. Management of adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64(7):1114-20.

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to P53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):594-604.

Wang R, Brattain MG. AKT can be activated in the nucleus. *Cell Sig* 2006;18(10):1722-31.

Wang YC, Lin RK, Tan YH, Chen JT, Chen CY, Wang YC. Wild-type p53 overexpression and its correlation with MDM2 and P14ARF alterations: an alternative pathway to non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(1):154-64.

Wang YC, Chen CY, Chen SK, Cherng SH, Ho WL, Lee H. High frequency of deletion mutations in p53 gene from squamous cells lung cancer patients in Taiwan. *Cancer Res* 1998;58(2):328-33.

Weber A, Langhanki L, Schutz A, Wittekind C, Bootz F, Tannapfel A. Alterations of the INK4a-ARF gene locus in pleomorphic adenoma of the parotid gland. *J Pathology* 2002;198(3):326-34.

Wong SCC, Chan JKC, Lee KC, Ksiao W. Differential expression of p16/ p21/ p27 and cyclin D1/ D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast. *J Pathol* 2001;194:35-42.

Yamamoto Y, Kishimoto Y, Virmani AK, Smith A, Vuitch F, Saavedra JA, et al. Mutations associated with carcinomas arising from pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Hum Pathol* 1996;27(8):782-6.

Yang JY, Zong CS, Xia W, Wei Y, Ali-Sayed M, Li Z et al. MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Mol Cell Biol* 2006;26(19):7269-82.

Zhang Z, Wang H, Li M, Agrawal S, Chen X, Zhang R. MDM2 is a negative regulator of P21WAF1/CIP1, independent of P53. *J Biol Chem* 2004; 279(16):16000-06.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2001;3(11):973-82.

Zhu QR, White FH, Tipoe GL. P53 oncoprotein accumulation in adenoid cystic carcinoma of parotid and palatine salivary glands. *Pathology* 1997;29:154-8.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 133/05**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa ***"Avaliação da co-imunoexpressão entre as proteínas MDM2 e P53, PAKT, PRb e P14^{ARF} em linhagens celulares de neoplasias de glândulas salivares"***, de responsabilidade da Pesquisadora **Marina de Deus Moura**, sob orientação da Profa. Dra. **Andréa Mantesso**.

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

São Paulo, 01 de setembro de 2005

Prof. Dr. **Rogério Nogueira de Oliveira**
Coordenador do CEP-FOUSP