YONARA MARIA FREIRE SOARES MARQUES

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MDM2, P53, P21^{WAF1} E
AKT EM NEOPLASIAS BENIGNAS DE GLÂNDULA SALIVAR**

São Paulo
2006

Yonara Maria Freire Soares Marques

**Estudo da expressão das proteínas Mdm2, P53, P21^{waf1} e Akt em
neoplasias benignas de glândula salivar**

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

Marques, Yonara Maria Freire Soares

Estudo da expressão das proteínas Mdm2, P53, P21^{waf1} e Akt em neoplasias benignas de glândula salivar / Yonara Maria Freire Soares Marques; 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. Neoplasias das glândulas salivares – Expressão de proteínas – Análise
2. Adenoma pleomórfico 3. Mioepitelioma 4. Patologia bucal

CDD 617.63
BLACK D65

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS,
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

Marques YMFS. Estudo da expressão das proteínas Mdm2, P53, P21^{waf1} e Akt em neoplasias benignas de glândula salivar [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

A meus pais e minhas duas irmãs

Que tanto amor, apoio e incentivo dedicaram a mim todos os dias, independente de minhas escolhas, atitudes e da distância que nos separa.

Ao meu marido Artur

Que sempre, com amor, me compreendeu e incentivou. Sou muito feliz por estar ao seu lado.

**As pessoas mais importantes de minha vida,
dedico este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. **Andrea Mantesso**, minha orientadora, pelos valiosos ensinamentos transmitidos, pela paciência, pela confiança em mim depositada e também pela oportunidade que me deu de continuar a sua linha de pesquisa.

À Professora Dra. **Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa**, pela expressiva colaboração na interpretação dos resultados e pela atenção sempre que precisei. Me espelho em sua competência e disponibilidade para minha vida profissional.

À Professora Dra **Ana Paula Veras Sobral** por me mostrar a importância e a satisfação no estudo da Patologia Bucal e pelo incentivo e apoio na escolha de minha área de atuação.

Ao Professor Dr. **Décio dos Santos Pinto Jr.** pela grande cooperação na interpretação dos resultados desta pesquisa e pelos ensinamentos durante todo o período que passei no laboratório de cultura de células.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP Dra. **Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães**, Dra. **Marilia Trierveiler Martins**, Dr. **Fábio Daumas Nunes** e Dra. **Karem Ortega**, por todo o aprendizado que me proporcionaram.

Ao Professor Dr. **Ruy Jaeger** pela importante colaboração na realização deste trabalho.

À Professora Dra. **Vera Araújo**, admirável profissional que ama e nos ensina a amar a Patologia. Agradeço pela valiosa colaboração na avaliação dos resultados, por disponibilizar o laboratório da faculdade São Leopoldo Mandic e por todo carinho demonstrado.

À querida amiga **Marina de Deus Moura de Lima** por compartilhar comigo experiências vividas, momentos felizes e difíceis também, nunca perdendo o companheirismo e o grande carinho que nos uniu desde os primeiros dias do curso. Juntas aprendemos cada técnica, cada passo que deveria ser dado para a conclusão de nossos trabalhos e como solucionar cada problema quando surgia. Nunca vou esquecer todo apoio e amizade demonstrados durante todos os dias nestes quase dois anos de convivência. O êxito deste trabalho também é mérito seu.

Ao querido amigo **Sérgio de Melo Alves Jr** pelo companheirismo, por todos os ensinamentos e por confiar em minha capacidade, mesmo quando as dificuldades me faziam fraquejar. Nunca vou esquecer nossa equipe da cultura, pois juntos rimos, sofremos (com a morte das células) e solucionamos problemas. De tudo isso restou uma bonita amizade e uma grande admiração por você.

Às amigas **Kívia Linhares, Fernanda Yamamoto, Flávia Calo, Aluana Dal Vechio** pelo companheirismo, pelos bons momentos e por todo conhecimento compartilhado, apesar de nossa pouca experiência.

A todos os **colegas do curso de Pós-Graduação** que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho. Agradeço pelos dias agradáveis e por me acolher muito bem como membro da família da Patologia Bucal.

À **Edna Toddai** (*in memória*) e **Elisa Santos** pelo importante auxílio técnico no Laboratório de Imunoistoquímica e de Patologia Cirúrgica, pelos conselhos e pelo sorriso amigo que me ajudou muito nos dias difíceis longe de minha família.

Ao Prof. Dr. **Fernando Soares**, médico patologista da disciplina de Patologia Geral da FOUSP e do Hospital do Câncer A.C. Camargo, por me fornecer alguns casos utilizados neste trabalho e por disponibilizar o laboratório de imunoistoquímica do Hospital do Câncer.

À Dra. **Vanessa Freitas** pela grande ajuda prestada na otimização de algumas técnicas.

Às funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal **Bia, Nair, Néia, Patrícia e Zilda** pela ajuda e companheirismo durante todos os dias do curso.

Às bibliotecárias **Glauci, Vânia e Águida** pela auxílio na formatação deste trabalho.

À **CAPES** pelo apoio financeiro com a bolsa de Mestrado.

Marques YMFS. Estudo da expressão das proteínas Mdm2, P53, P21^{waf1} e Akt em neoplasias benignas de glândula salivar [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

A proteína P53 pode estar virtualmente alterada em todos os cânceres humanos e portanto, na ausência de mutação, uma possibilidade para a inativação da p53 é a formação de complexo com outras proteínas, tal como a proteína Mdm2. Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram a superexpressão de Mdm2 na ausência de expressão da proteína P53 em adenomas pleomórficos. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão das proteínas Mdm2, P53, P21 e Akt em adenoma pleomórfico e o mioepitelioma através das técnicas de imunohistoquímica, western blotting e imunofluorescência. A superexpressão de Mdm2 e Akt foi encontrada na maioria das linhagens e lesões utilizadas neste estudo enquanto as proteínas P53 e P21 não demonstraram expressão nas neoplasias estudadas. As superexpressões das proteínas Mdm2 e Akt estão relacionadas à tumorigênese em neoplasias benignas de glândula salivar.

Palavras-Chave: Mdm2; P53; P21 ; Akt; adenoma pleomórfico; mioepitelioma

Marques YMFS. Study of the expression of Mdm2, P53, P21 and Akt proteins in benign neoplasms from salivary gland [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

The P53 protein can be altered in virtually all human cancers and in the absence of mutations, P53 inactivation is possible via complex formation with others proteins, such as the Mdm2. Previous studies from our laboratory showed overexpression of mdm2 and lack of p53 expression in pleomorphic adenomas. The aim of this study was to analyze the expression of Mdm2, P53, P21 and Akt proteins in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas by Western blotting, immunohistochemistry and immunofluorescence techniques. Overexpression of Mdm2 and Akt was present in the majority of cell lineages and tumors studied, while the expression of P53 and P21 proteins was considered absent. Overexpression of Mdm2 and Akt are related to the tumorigenesis of benign salivary gland neoplasms.

Keywords: Mdm2; P53; P21; Akt; pleomorphic adenoma; myoepithelioma

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1- Expressão Imunoistoquímica em adenomas pleomórficos.....	75
Figura 5.2- Expressão Imunoistoquímica em mioepitelioma.....	76
Figura 5.3-Expressão das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt, comparadas a expressão da β -actina nas linhagens AP4, M1 e nas linhagens controles.....	79
Figura 5.4- 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.....	79
Figura 5.5- Imunoexpressão de Mdm2, P21 e pAkt nas linhagens de AP4 e M1.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Localização das neoplasias de glândula salivar.....	56
Tabela 4.2- Relação das linhagens de neoplasias de glândula salivar.....	57
Tabela 4.3- Imunoistoquímica : anticorpos, concentração e tempo de incubação.....	59
Tabela 4.4- Gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm).....	65
Tabela 4.5- Relação dos anticorpos que foram utilizados no Western Blotting.....	66
Tabela 4.6- Concentrações, clones, procedência e tempo de incubação dos anticorpos utilizados na Imunofluorescência.....	69
Tabela 5.1- Percentual da expressão imunoistoquímica das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt em adenomas pleomórficos , mioepitelioma e glândulas.....	73
Tabela 5.2- Análise comparativa da expressão imunoistoquímica das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt entre adenomas pleomórficos e glândulas salivares normais.....	74
Tabela 5.3- Análise comparativa da expressão imunoistoquímica das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt entre mioepiteliomas e glândulas não neoplásicas..	74
Tabela 5.4- Análise estatística dos resultados obtidos pelas leituras das bandas (triplicatas) na linhagem de adenoma pelomórfico.....	80
Tabela 5.5- Análise estatística dos resultados obtidos pelas leituras das bandas (triplicatas) na linhagem de mioepitelioma.....	80
Tabela 5.6- Expressão e localização das proteínas nos compartimentos celulares..	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

P53	Proteína P53
Mdm2	Proteína Mdm2
P21	Proteína P21
Akt	Proteína Akt
pAkt	Akt fosforilado
p53	Gene p53
mdm2	Gene mdm2
p21	Gene p21
CDK	Ciclina dependente de quinase
EGFR	Do inglês “Epithelial growth factor receptor” ou receptor do fator de crescimento epitelial
PCR	Do Inglês “Polymerase chain reaction” ou reação de polimerase em cadeia
DNA	Do Inglês “ Desoxyribonucleic acid” ou ácido desoxirribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
PBS	Soro fetal bovino
TBST	“Tris-Buffered Saline Tween-20”
TRIS	“Tris-Hydroximetil-Aminometano”
EDTA	Ácido etilenodiamiotetra acético
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbeco

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
°C	graus Celsius
β beta	segunda letra do alfabeto grego
μm	micrômetro
x	vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Adenoma pleomórfico	16
2.2	Mioepitelioma	18
2.3	Função e interação entre as proteínas P53, Mdm2, P21 e pakt	20
2.4	P53, Mdm2, P21 e pakt – Expressão e interação em neoplasias	26
2.5	P53, Mdm2, P21 e pakt – Expressão e interação em neoplasias de glândula salivar	37
3	PROPOSIÇÃO	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	Casuística	49
4.2	Técnica de Imunoistoquímica	51
4.3	Técnica de Cultivo Celular	53
4.4	Técnica de Western Blotting	55
4.5	Técnica de Imunofluorescência	60
5	RESULTADOS	62
5.1	Expressão imunoistoquímica das proteína P53, Mdm2, P21 e pakt	62
5.2	Quantificação da proteínas através técnica de Western Blotting	68
5.3	Imunoexpressão e localização das proteínas através técnica de Imunofluorescência	71
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÃO	83
	REFERÊNCIAS	84
	ANEXO	94

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias de glândulas salivares representam 3% dos tumores de cabeça e pescoço. A literatura encontra-se repleta de trabalhos que procuram não só delinear com precisão os aspectos clínicos e microscópicos das neoplasias de glândulas salivares, mas também desvendar os fatores responsáveis pelo seu mecanismo de formação e progressão.

Embora muito tenha sido pesquisado a respeito de mutações gênicas relacionadas com os tumores de glândulas salivares, pouca importância tem sido dada às proteínas produzidas por esses genes envolvidos na tumorigênese e/ou comportamento tumoral nessas lesões.

O gene *mdm2* está amplificado em aproximadamente 20% dos sarcomas de tecidos moles. A proteína, produto deste gene, forma complexo com o tipo mutante e selvagem da proteína P53 e inativa sua função. A amplificação do gene *mdm2* e a super expressão da proteína têm sido envolvidas na tumorigênese e/ou no desenvolvimento de vários tumores benignos e malignos humanos. Porém, o Mdm2 trabalha em conjunto com outras proteínas, tais como o P21 e o Akt. Sendo estas últimas importantes para uma análise mais completa do caminho percorrido pela Mdm2 na tumorigênese.

Sendo assim, nos propusemos a analisar as proteínas P53, Mdm2, P21 e Akt, através das técnicas de Imunoistoquímica, Western Blotting e Imunofluorescência em neoplasias benignas de glândula salivar buscando esclarecer a influência destas proteínas na tumorigênese e/ou progressão tumoral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Adenoma Pleomórfico

O adenoma pleomórfico é a neoplasia de glândula salivar mais comum e corresponde a aproximadamente 60% de todas as neoplasias de glândulas salivares. Acomete com mais freqüência à glândula parótida, representando 80% dos casos, seguida da submandibular (10%) e das glândulas salivares menores (10%). Apresenta uma leve predileção pelo sexo feminino, com taxa de ocorrência de 1,3:1 (M:H) (BARNES et al., 2005; ITO et al. 2005; LOYOLA et al., 1995).

Apresenta-se usualmente como uma neoplasia de aproximadamente 2 a 5 cm, de crescimento lento e indolor. A lesão tende a formar uma estrutura ovóide e bem-definida, sendo freqüentemente encapsulada (BARNES et al., 2005).

O tumor pode exibir uma grande diversidade morfológica, porém histologicamente apresenta componentes essenciais representados por células epiteliais, células mioepiteliais, cápsula e elementos estromais ou mesenquimais. O componente epitelial apresenta uma grande variedade de tipos celulares, incluindo células cuboidais, basalóides, pavimentosas, fusiformes, plasmocitóides e claras. Raramente são vistas células mucosas, sebáceas e acinares serosas. As células do componente epitelial são citologicamente benignas e, freqüentemente, com núcleo vacuolado, sem a presença de nucléolo proeminente e baixa freqüência de mitoses. O epitélio usualmente forma lençóis ou estruturas ductiformes. Os ductos são

formados por células luminais cubóides com uma camada de células mioepiteliais ao redor dessas. Este componente mioepitelial pode ser formado por células morfológicamente similares a camada luminal ou apresentar o citoplasma claro e núcleo hipercromático, sendo em algumas lesões angulado. Os ductos freqüentemente exibem material eosinofílico em seu interior e metaplasia escamosa, com ou sem a presença de pérola de queratina, pode ser vista nos ductos ou no lençol de células. As células mioepiteliais podem formar um padrão reticular ou apresentar-se na forma de lençol de células fusiformes, plasmocitóide ou hialina. O componente Mesenquimal pode ser mucóide/mixóide, cartilaginoso ou hialinizado e às vezes este tecido forma a porção mais volumosa da neoplasia (BARNES et al., 2005).

Para o diagnóstico diferencial entre outros tumores de glândula a análise imunoistoquímica do adenoma pleomórfico apresenta imunopositividade para vimentina em grande parte das células não luminais (poligonais, fusiformes e plasmocitóides) do tumor e não expressa actina muscular. As estruturas semelhantes a ductos presentes nesta lesão demonstram expressão das citoqueratinas 7, 8 e 19, da mesma forma que as células luminais intercalares das glândulas salivares normais, porém com expressão adicional da citoqueratina 14 (ARAÚJO; CARVALHO; ARAÚJO, 1994; ARAÚJO et al., 2000b).

O tratamento de escolha para o adenoma pleomórfico é a excisão cirúrgica total, porém nos pacientes que apresentam fenótipo com distintas propriedades de malignização, é recomendada a excisão cirúrgica com margem de segurança (FRIEDRICH et al., 2005).

Embora o adenoma pleomórfico seja uma neoplasia benigna, esta pode causar problemas na conduta clínica devido a tendência de recorrer e o risco de

transformação maligna. As recorrências são raras em glândula menor, mas em uma meta-análise desta neoplasia em glândula parótidas 3.4% das lesões têm recorrido após 5 anos e 6.8% após 10 anos, sendo as recorrências mais freqüentes em pacientes jovens (BARNES et al., 2005). Um estudo retrospectivo de 35 pacientes com adenoma pleomórfico recorrente de parótida, tratados cirurgicamente, demonstraram uma taxa de transformação maligna de 5.7% dos casos, em 15 anos de acompanhamento (MAXWELL; HALL; FREEMAN, 2004; FRIEDRICH et al., 2005) realizou um estudo com 94 casos de adenomas pleomórficos e verificou que a taxa de transformação maligna foi equivalente a 8.5%.

2.2 Mioepitelioma

O Mioepitelioma é uma neoplasia benigna, a qual representa 1,5% de todas as neoplasias de glândula salivar, correspondendo a 2,2% de todas as neoplasias benignas de glândula salivar maior e 5,7% de glândula menor. O mioepitelioma não apresenta predileção por sexo e acomete com mais freqüência a glândula parótida (40%), podendo também acometer glândulas menores do palato duro e mole ou outras glândulas menores com menor freqüência (ELLIS; AUCLAIR, 1996).

Apresenta-se usualmente como uma neoplasia de menos de 3 cm de diâmetro, sólida e bem-circunscrita, de crescimento lento e indolor (BARNES et al., 2005). O padrão histológico é composto quase exclusivamente por lençol, ilhas ou cordões de células com diferenciação mioepitelial que pode exibir uma aparência fusiforme, plasmocitóide, epitelióide ou com citoplasma claro. O estroma ao redor

das células pode ser colagenoso ou mucóide. Alguns mioepiteliomas são compostos predominantemente por células poligonais claras com citoplasma claro, contendo grande quantidade de glicogênio, mas desprovido de mucina ou gordura. Alguns mioepiteliomas, podem apresentar ocasionalmente estruturas semelhantes a ductos e espaços microcísticos intercelulares. O diagnóstico diferencial de ser feito com o adenoma pleomórfico, porém em relação a este último, o mioepitelioma apresenta um relativa falta de estruturas ductais e ausência de áreas mixocondróides ou condróide (BARNES et al., 2005).

Da mesma forma que o adenoma pleomórfico o mioepitelioma expressa vimentina na maioria das células (fusiformes e plasmocitóides) do tumor e não exibe expressão da actina muscular, porém a marcação imunoistoquímica para as citoqueratinas é variável não apresentando um padrão de marcação comparável com a glândula salivar normal, como o adenoma pleomórfico (ARAÚJO; CARVALHO; ARAÚJO, 1994; ARAÚJO et al., 2000b).

O tratamento recomendado é a excisão cirúrgica completa. O mioepitelioma pode sofrer transformação maligna, especialmente em neoplasias não tratadas e com longo tempo de permanência, ou em neoplasias com múltiplas recorrências. O mioepitelioma apresenta menor tendência a recidivar quando comparado ao adenoma pleomórfico (BARNES et al., 2005).

2.3 Função e interação entre as proteínas P53, Mdm2, P21 e Pakt

O produto do gene p53 foi mapeado por Rotter et al.(1984). A partir deste estudo, a proteína P53 tem sido alvo de estudos em diversos campos de investigação.

A mutação e perda da heterozigose do gene p53 e/ou acúmulo do produto protéico é associado com o aumento da proliferação celular e transformação maligna (KIKUCHI-YANOSHITA et al., 1992; NIGRO et al., 1989).

O gene p53, considerado um gene supressor de tumor, está localizado no braço curto do cromossomo humano 17p13.1 e codifica uma fosfoproteína nuclear cuja função primordial é prevenir a propagação de células geneticamente danificadas. Sendo assim, em condições de normalidade, seus níveis celulares são baixos devido à sua meia-vida curta. Contudo, mediante sinais de estresse tanto intracelulares como extracelulares, a proteína P53 passa do estado latente para o ativado por meio de fosforilação e acetilação de resíduos específicos da sua molécula. Como resultado, ocorre rápida estabilização e aumento em seus níveis, assim como seu transporte para o núcleo. A P53 acumulada se liga ao DNA e estimula a transcrição de vários genes que medeiam os dois efeitos principais do p53: interrupção do ciclo celular e a apoptose. Essas funções são coordenadas de tal forma que o gene p53 dentro de uma célula atua orquestrando sinais emanados de uma grande variedade de vias celulares. À medida que funciona de maneira complexa, a proteína P53 é objeto de diversas ordens de mecanismo de regulação

que a mantêm potencialmente em atividade até que cesse a necessidade (CHANG; SYRJANEN; SYRJANEN, 1995; COTRAN; KUMAR; COLIINS, 1999).

A mutação no gene p53 é a alteração mais comum encontrada em tumores malignos humanos (BOSARI; VIALE, 1995). Muitas mutações pontuais do gene p53 podem alterar a conformação da proteína P53 selvagem resultando em estabilização e acúmulo da proteína nas células, permitindo assim sua detecção pela técnica de imunohistoquímica (HARDISSON, 2003).

Medina e Kittrell (2003) realizaram um estudo com ratos para verificar a influência do p53 sobre a ação protetora dos hormônios para o desenvolvimento do câncer de mama e concluíram que a ausência da função do p53 anula o efeito protetor dos hormônios contra o câncer de mama induzido por carcinógeno químico.

Como já foi dito, o gene p53 pode estimular a transcrição de uma grande variedade de genes responsáveis pelo controle da proliferação celular, dentre estes o gene mdm2, que irá depender dos níveis de p53 para ser transcrito em condições normais (LI et al., 2003).

O gene mdm2 foi inicialmente clonado a partir de células Balb/c 3T3 transformadas espontaneamente e, quando superexpresso, mostrou aumentar o potencial tumorigênico nestas células (FAKHARZADEH; TRUSKO; GEORGE, 1991). O gene mdm2, mapeado no cromossomo 12q13-14, foi originalmente identificado como um gene altamente amplificado em uma linhagem de fibroblastos tumorigênicos transformados. O produto desse gene forma complexo com o tipo mutante e selvagem da proteína P53 e inativa a função desta última (MOMAND et al., 1992).

Em caso de dano ao DNA, quando este é reparado com sucesso ou mesmo no final da resposta a um estresse celular, a proteína P53 ativa o gene mdm2. O

mdm2 constitui um potente regulador negativo da p53 que, por sua proteína correspondente, inibe a atividade da proteína P53.

A proteína Mdm2 se liga à proteína P53 levando-a a degradação por meio de sua própria ubiquitinação ou através da estimulação da atividade ligase ubiquitina E3, responsável pela exportação nuclear e degradação pela protease 26S (FANG et al., 2000; HONDA; YASUDA, 1999; VOUSDEN; LU, 2002). Baixos níveis de atividade do Mdm2 induzem a mono-ubiquitinação e exportação nuclear do P53, enquanto altos níveis promovem a poliubiquitinação e maior degradação nuclear do P53 (SHIEH et al., 1997).

Oliner et al. (1992) em estudo realizado pelo mesmo grupo que clonou o gene, mostraram que a proteína Mdm2 recombinante agora derivada de material humano, se unia *in vitro* à P53, e assim utilizaram clones do gene mdm2 para localizá-lo no cromossomo 12q13-14. Como esta região mostra-se alterada em muitos casos de sarcoma, os autores procuraram alterações deste gene nestes tipos de cânceres e encontraram o gene mdm2 amplificado em 1/3 dos 47 sarcomas avaliados. O grupo estudado incluía neoplasias de origem óssea e de tecidos moles. Os autores concluíram que estes resultados eram consistentes com a hipótese de que o Mdm2 se une ao P53 e que a amplificação do mdm2 em sarcomas é responsável pelo escape do controle celular regulado pelo p53.

Os níveis de expressão do Mdm2, a associação do Mdm2-P53 e a atividade ligase ubiquitina E3 do Mdm2, as quais promovem a regulação negativa do P53, são reguladas também pela fosforilação, oligomerização, e união a outros fatores, tais como o P14 (KAMIJO, 1998; MAKI, 1999; SHIEH et al., 1997).

O Mdm2 está comumente superexpresso em um extenso espectro de tumores (MOMAND; ZAMBETTI, 1997), porém alta porcentagem de mutações no

p53 em um tipo de tumor em particular, não significa necessariamente uma alta porcentagem de superexpressão do Mdm2 (ou vice versa) (CHANG; SYRJANEN; SYRJANEN, 1995).

A amplificação do gene *mdm2* e a superexpressão da proteína estão envolvidas na tumorigênese e ou desenvolvimento do tumor em vários tumores malignos humanos (VELOSO et al., 2000).

Outra proteína que sofre influência da via P53-Mdm2 é a proteína P21.

O gene *p21^{WAF1/CIP1}* é ativado pela P53 após um dano ao DNA, levando a parada do ciclo celular. A P21 causa parada no crescimento celular através da inibição de Quinases dependentes de ciclinas (CDKs), as quais são requeridas para a progressão do ciclo. A proteína P21 atua como o principal efetor da proteína P53 e dessa forma, a expressão da proteína P21 pode ser usada para monitorar o estado da proteína P53. A proteína P21 tem sido observada imunoreativamente em uma variedade de cânceres humanos. Evidências experimentais têm indicado que elevado nível de P21 está relacionado à função normal ou aumentada da proteína P53, e que baixo nível de P21 está relacionado à inativação da função da P53 (EL-DEIRY et al., 1993).

Além de promover a parada do ciclo celular a proteína *P21^{WAF1}* pode interagir com antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e controlar o reparo do DNA (LUO; HURWITZ; MASSAGNE, 1995).

Porém não apenas o P53 regula o P21, esta pode sofrer regulação pela proteína Mdm2. A Proteína Mdm2 pode atuar como um regulador negativo da proteína P21 através de interação física, a qual promoverá facilitação da degradação da P21 pelo proteossomo 20S, independente da ação da P53 e da ubiquitinação. A

inativação da P21 apresenta um papel crítico na atividade da Mdm2 (ZHOU et al., 2004).

Neste intrincado mecanismo de sobrevivência e proliferação celular a proteína Akt também participa de processos fisiológicos e neoplásicos. Sua participação é importante na ação de regular positivamente fatores anti-apoptóticos e negativamente fatores pró-apoptóticos (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999).

Para ser ativada, a proteína Akt depende da disponibilidade intracelular de PI3-K (fosfatidilinositol-3 kinase), pois quando há 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 a Akt sofre fosforilações em diferentes sítios e quando ativada, essa proteína passa a ter localização citoplasmática e nuclear (ANDJELKOVIC et al., 1997; BORGATTI et al., 2000; NICHOLSON; ANDERSON, 2002).

Segundo Wang e Brattain (2006) o Akt pode apresentar localização nuclear por três fatores principais: união a outras proteínas, estimulação neoplásica e formação de proteínas quiméricas.

Com relação à proliferação celular, o Akt também possui amplo espectro de ação ao promover ou impedir a ação de diversas proteínas relacionadas ao ciclo celular, dentre elas P21, Mdm2 e P53 (ASSOIAN; SCHWARTZ, 2001; NICHOLSON; ANDERSON, 2002).

O Akt não afeta os níveis do RNAm do p53, mas promove ubiquitinação e degradação da proteína P53, confirmando estudos realizados por Mayo e Donner. (2001) e Zhou et al. (2001), os quais afirmam que o Mdm2 pode ser fosforilado, e esta fosforilação promove a entrada nuclear do Mdm2. Embora estes estudos

tenham mostrado que o Akt promove translocação do Mdm2, não foi detectado qualquer efeito do Akt sobre o Mdm2 de localização subcelular. Porém, o Akt facilita a função do Mdm2 na promoção da ubiquinização do P53 pela fosforilação da Serina¹⁸⁶ (HIRATA; KIUCHI, 2003).

Feng et al. (2004), realizaram um estudo para avaliar a função do Akt sobre as funções do Mdm2 e P53. Sugeriram que o Akt exerce um papel fundamental sobre o controle da sinalização do Mdm2-P53, pela regulação da estabilidade do Mdm2 através da fosforilação do mesmo. Segundo estes mesmos autores, além de promover a translocação do mdm2 para o núcleo, quando o complexo PI3K/PKB (proteínas da via do Akt) é ativado pelo fator de crescimento, o Mdm2 é fosforilado em dois locais Ser¹⁶⁶ e Ser¹⁸⁶. Esta fosforilação protege o Mdm2 da própria ubiquitinação, levando a estabilidade do mesmo. Logo, essa fosforilação pelo PKB irá aumentar a habilidade do Mdm2 em promover a ubiquitinação e degradação do P53.

Em relação ao ciclo celular, o Akt pode atuar através da fosforilação da proteína P21 localizada no citoplasma, após um estímulo proliferativo. Desta forma, o ciclo celular deixará de sofrer o controle desta proteína, a qual é reponsável pela parada do ciclo (TESTA; BELLACOSA, 2001; ZHOU et al., 2001).

O Akt é um oncogene que freqüentemente encontra-se superexpresso em carcinoma de mama, próstata, pulmão, cabeça, pescoço e em melanoma (LIM et al., 2005)

Segundo Sabbatini e McCormick (1999), a via do PI3K-Akt age na inibição da atividade transcricional do p53 e reduz a função pro-apoptótica do P53.

Pela exposição destes dados, notamos como a compreensão das vias de regulação do ciclo celular é importante para a total elucidação dos mecanismos

responsáveis pela tumorigênese. Acredita-se que a proteína P53 pode estar virtualmente alterada em todos os cânceres humanos e portanto, na ausência de mutação, uma possibilidade para a inativação da P53 é a formação de complexo com outra proteína, nesse sentido, a interação com a proteína Mdm2 torna-se o principal alvo de vários estudos (PIETTE; NEEL; MARECHAL, 1997; SKOMEDAL et al., 1999).

2.4 P53, Mdm2, P21 e Pakt – Expressão e interação em neoplasias

Como diversos estudos têm demonstrado, existe uma grande variedade de proteínas capaz de interagir com a proteína P53, inativando-a ou agindo como um facilitador da supressão tumoral pela mesma.

Soini et al. (1992), investigaram a expressão da proteína P53 em tecido linfóide benigno e maligno pela técnica de imunoistoquímica. A presença de marcação nos casos de linfoma Hodgkin e não-Hodgkin indicou que a mutação do gene p53 pode ter um papel importante no desenvolvimento desses tumores. A forte marcação da P53 nos linfomas de alto grau de malignidade, sugere que o P53 pode estar envolvido na transformação de linfomas de baixo grau para os de alto grau de malignidade, devido a ausência de marcação nas lesões benignas. Logo, a marcação imunoistoquímica para a P53, em lesões linfóides, pode indicar malignidade.

McCann et al. (1995) realizaram um estudo com 100 casos de neoplasias de mama. Investigaram a amplificação do gene e a expressão da proteína Mdm2,

associando os resultados ao acúmulo da proteína P53. Os resultados demonstraram que 4% dos casos apresentaram amplificação do mdm2. A expressão das proteínas demonstrou que os tumores positivos para o mdm2 estavam significativamente relacionados aos tumores com níveis baixos de marcação para o P53. Os autores consideraram então que as alterações no gene mdm2 podem representar um caminho alternativo da via p53 na tumorigênese de neoplasias de mama, mas as alterações não são mutuamente exclusivas em todos os casos, pois um dos casos onde o gene mdm2 se encontrava amplificado, mostrava uma forte marcação nuclear para a proteína P53.

Estudando uma série de 36 casos de carcinomas epidermóides oral e de laringe, Piffkó et al. (1996) avaliaram a ação das proteínas Mdm2 e P53 como marcadores proliferativos e antiproliferativos, através da técnica de imunohistoquímica. Segundo os autores, o acúmulo da proteína P53 no interior das células, marca uma disfunção da sinalização do p53. A co-expressão das proteínas P53 e Mdm2 em carcinomas sugere que além da mutação do gene p53, que ocorre em 70% dos carcinomas de cabeça e pescoço, a formação do complexo entre estas duas proteínas pode contribuir para a inativação e acúmulo da P53 no interior da célula.

Reid et al.(1996), examinaram a amplificação do mdm2, a mutação do p53 e o acúmulo da proteína P53 em 52 fibrohistiocitomas malignos relacionando os resultados aos prognósticos. A amplificação do gene Mdm2 foi encontrada em 29% dos casos e 12% demonstraram anormalidades na expressão da proteína. A presença de amplificação do mdm2 ou acúmulo da proteína P53, não apresentaram efeito significativo no prognóstico dos pacientes. A sobrevida também não apresentou significativa diferença nos pacientes com mutação do gene p53. No

entanto, quando os pacientes foram classificados pelo grau histológico, os resultados indicaram que os pacientes com mutação do p53 podem apresentar a sobrevida diminuída.

Caffo et al. (1996) realizaram um estudo para investigar o valor prognóstico da expressão do P53 e P21 em carcinoma de mama, através de análise imunoistoquímica e acompanhamento a longo prazo dos pacientes estudados. Os autores observaram que a expressão da P21 estava associada ao tamanho do tumor, a presença de metástase nodal, ao alto grau histológico e ao alto número de mitose. A expressão também apresentava relação com o curto de tempo livre da doença. Em pacientes tratados, uma análise multivariada mostrou que o fenótipo P21-/P53+ estava associado ao curto tempo livre da doença e sobrevida. Segundo os dados relatados acima os autores formularam a hipótese que a expressão heterogênea pode apresentar relevância clínica para a resposta terapêutica a quimioterapia/hormonoterapia. O fenótipo P21-/P53+ pode corresponder a superexpressão do P53, derivada da perda da função da mesma. Nos casos em que a função do P53 estava provavelmente prejudicada, pode ter havido impedimento no checkpoint em G1 e incapacidade da atividade apoptótica na resposta da droga frente ao DNA danificado.

Pilotti et al. (1997), avaliaram o padrão distinto de expressão do mdm2/p53 em subgrupos de lipossarcomas, e as implicações para os diferentes mecanismos patogénéticos. Os resultados demonstraram a existência de 3 grupos de lipossarcomas patogeneticamente distintos. No primeiro grupo a inativação do p53 mediada pelo mdm2, pode estar relacionada ao mecanismo patogénético; no segundo grupo, a mutação do gene p53 parece ser o principal fator patogénético; e o

terceiro grupo foi caracterizado pelo perfil citogenético exclusivo, sem qualquer envolvimento dos genes p53 e mdm2.

Araújo et al. (1997), avaliaram a relação entre o grau de malignidade e a expressão da proteína P53 em 40 casos de carcinoma epidermóide. A expressão da P53 foi encontrada em 62.5% dos carcinomas estudados. A positividade da marcação para a P53 mostrou correlação com o grau histológico de malignidade, o grau de queratinização, o polimorfismo nuclear e o número de mitoses.

Craanen et al. (1999) examinaram a inter-relação entre a expressão das proteínas P53, Mdm2 e P21 na carcinogênese gástrica através da técnica imunoistoquímica. O estudo foi realizado em mucosa gástrica normal, gastrite crônica, carcinomas gástricos precoces e lesões precursoras. Os autores obtiveram como resultado a expressão de P21 na ausência de P53 e Mdm2 em mucosa gástrica normal, gastrite crônica e metaplasia intestinal. Foi observada a expressão de P53 em 60% dos carcinomas e de P21 em 80%, enquanto o Mdm2 estava ausente em todos os carcinomas. Baseados nos dados relatados, sugeriu-se que a expressão de P21 em mucosa não neoplásica deve estar relacionada à diferenciação terminal ou senescência celular, possivelmente de maneira independente do P53. Correlacionando os dados clínicos, os resultados mostraram que diferenças na expressão do P21 não estão relacionada com o padrão de crescimento dos carcinomas precoces.

Através de reação de PCR e imunoistoquímica, foram estudadas as alterações no gene p53 correlacionadas a expressão de proteínas associadas ao ciclo celular (P21, ciclina D1, CDK4, Mdm2 e EGFR) em carcinoma de corpo de útero. Foi demonstrado que a mutação do gene p53 não foi significativamente relacionado com a expressão ou regulação de nenhuma das proteínas estudadas.

As reações de imunohistoquímica demonstraram que houve aumento nos níveis das proteínas P53 (77%), P21 (36%), ciclina D1 (45%), CDK4 (77%), EGFR (8%) e Mdm2 (32%) dos casos. Foi demonstrada significativa associação entre a expressão das proteínas P53 - Mdm2, e P21 - Mdm2, além disso os resultados revelaram aumentados níveis da proteína P53 em casos Mdm2-positivos, sem a presença de mutação para o gene p53, indicando a estabilização e inativação da P53 pelo complexo formado com a Mdm2 (SKOMEDAL et al., 1999).

Regezi et al. (1999), realizaram um estudo com objetivo de avaliar pela técnica imunohistoquímica as proteínas relacionadas ao ciclo celular (P53, P21, Rb e Mdm2) em carcinoma de língua com espectro de idades diferentes. Os autores concluíram que as expressões das proteínas estudadas, apresentaram marcação heterogênea. Foi sugerida a indução da proteína P21 de forma independente da via do P53, baseado nos resultados do estudo. Constatou-se também que a supressão da proteína P53 estava associada a expressão da proteína Mdm2. Não houve diferença significativa entre as expressões das proteínas estudadas em cada idade avaliada

Broll et al. (1999), estudaram a expressão das proteínas P53, Mdm2 e o RNAm em adenocarcinoma de colo retal, pela técnica de imunohistoquímica e PCR. Os autores concluíram que pode existir um mecanismo regulatório entre o P53 e o Mdm2 em adenocarcinomas de colo retal, com significativa associação entre as expressões do RNAm do p53 com o RNAm mdm2, do RNAm p53 com a proteína Mdm2 e do RNAm mdm2 com a proteína Mdm2. Não houve associação significativa entre as expressões das proteínas P53 e Mdm2, nem entre a proteína p53 e o RNAm do mdm2.

Ng et al. (1999) estudaram a expressão do P21 em 88 carcinomas epidermóides orais, correlacionando com o P53, Mdm2 e o índice de proliferação celular. Foram observadas marcações positivas para o P21, P53 e mdm2 respectivamente em 82,4%, 67,8% e 25,9% dos casos avaliados. A alta expressão da P21 foi verificada em tumores com ativa proliferação ($P=0.025$) e a positividade, da mesma, estava correlacionada com a expressão da Mdm2, mas não com a P53. A expressão da P53 foi maior nos tumores com menor diferenciação celular ($P=0.038$). Não houve associação entre o estágio TNM em nenhuma das proteínas estudadas ou o índice de proliferação celular. Os autores concluíram que a proteína P21 estava superexpressa nos carcinomas epidermóides orais avaliados, e este fato relacionou-se com o índice de proliferação celular e a expressão do Mdm2, independente de alterações no P53. A superexpressão do P21 apenas, parece representar insuficiente papel na supressão da progressão tumoral.

Veloso et al. (2000), avaliaram o status do gene p53 e a expressão das proteínas P53, Mdm2 e P21 em 88 casos de carcinoma colorretal. Foram utilizadas as técnicas de imunoistoquímica, para avaliar a expressão das proteínas P53, Mdm2 e P21, e o sequenciamento e análise do polimorfismo conformacional, para avaliar a mutação do gene p53. Os autores concluíram que havia uma alta correlação entre o status do gene p53 e a expressão da proteína P53. O acúmulo da proteína P53 pode indicar a presença de uma mutação na maioria dos casos ou a inativação da proteína. A ausência de marcação imunoistoquímica, embora possa ser associado com a P53 selvagem e funcionalmente ativa, pode também esconder uma mutação não detectada ou a inativação do P53.

Domagala et al. (2001), estudou a expressão do P21WAF1/Cip1 em carcinomas ductais invasivos de mama, relacionando com o acúmulo da proteína

P53, a taxa de proliferação e a sobrevida dos pacientes em 5 anos. Foram utilizadas as técnicas de imunoblotting e imunoistoquímica, além da coleta de dados clínicos. O resultado desse estudo demonstrou a relação inversa entre a expressão do P21 e o acúmulo do P53 no carcinoma estudado, no entanto os autores sugerem que o P21 pode ainda ser induzido em tumores com P53 mutante. Correlacionando os resultados com os dados clínicos, foi possível encontrar uma significativa associação entre a expressão do P21 e a baixa taxa de proliferação. Estes resultados sugerem o controle do crescimento celular mediado pelo P21 em câncer de mama. Não houve significativa associação entre a expressão do P21 e a sobrevida em 5 anos, porém os pacientes tratados com quimioterapia adjuvante, o fenótipo P21-/P53+ estava associado ao pior prognóstico.

Göhring et al. (2001) estudaram a expressão imunoistoquímica da proteína P21^{WAF} relacionada a expressão de algumas proteínas, dentre elas a P53, e o prognóstico de carcinomas invasivos de mama. Como resultado, obtiveram presença de marcação da P21 em 32,2% dos 307 tumores estudados. Com relação aos dados clínicos, morfológicos e biológicos, não houve correlação significativa entre a expressão da P21 e os parâmetros estudados. Foi demonstrado que a expressão do P21 representa um fator independente na progressão de carcinoma de mama e os resultados confirmaram a hipótese da indução do p21 de maneira independente expressão do P53. Pôde-se concluir que a detecção imunoistoquímica do P21 não representou um fator prognóstico útil para a escolha do tratamento no câncer de mama.

Um estudo realizado por Matsumoto et al. (2004), demonstrou a presença da proteína Mdm2 e P53 através de imunohistoquímica em xantastrocitomas pleomórficos. Nas amostras estudadas, todas apresentaram pelo menos

imunopositividade focal para Mdm2 e em apenas uma das amostras o P53 apresentou imunopositividade, porém bastante fraca. No entanto, nenhuma das amostras mostrou o gene mdm2 amplificado. Logo, os autores sugeriram que o acúmulo da proteína Mdm2 sem a amplificação do gene pode ser um dos maiores eventos moleculares que ocorre na tumorigênese dessas neoplasias.

Tachibana et al. (2004), estudaram a disfunção da via do p53 em câncer colorectal humano. Foram utilizadas as técnicas de imunistoquímica e PCR, com a finalidade de investigar a mutação do gene p53 e a expressão de fatores associados ao p53, dentre eles o Mdm2 e o P14. Os resultados demonstraram que de 8 casos que apresentaram gene p53 selvagem, 6 mostraram uma regulação negativa do RNAm P14 e 3 casos superexpressaram o RNAm Mdm2. Segundo os autores, o achado mais proeminente do estudo foi que 96% nos cânceres estudados mostraram interrupção da função normal da via do supressor de tumor p53 por anormalidades no próprio p53, por perda de função de fatores regulatório (P14) ou pela superexpressão de fatores destinados a degradação do P53 (Mdm2).

Vasko et al. (2004), estudaram a expressão, ativação e a localização do Akt em tumores benignos e malignos de tireóide, através de imunistoquímica, PCR e imunofluorescência. Os resultados demonstraram que tecidos tireóideos benignos, raramente apresentaram expressão da proteína AKT, exceto para adenomas foliculares atípicos. Enquanto nos tumores malignos houve forte expressão, principalmente nas regiões de invasão capsular e vascular. A imunofluorescência demonstrou localização nuclear do Akt em células benignas com atipias e em células invasivas nos carcinomas. Segundo os autores o mecanismo que leva a ativação e localização nuclear do Akt ainda é incerto, mas o estudo revela que a localização

nuclear do Akt está associada a maior invasão tumoral e metástases. Em tumores benignos de tireóide esta mesma localização está relacionada a atipias celulares.

Dong et al. (2005) investigaram a expressão da P53 e da Mdm2 em 59 casos de carcinoma de pâncreas, através da imunoistoquímica, e suas correlações com parâmetros clínico-patológico. Ambas as proteínas estiveram presentes em ,relativamente, alta expressão nos carcinomas de pâncreas. Segundo os autores, a expressão da P53 e da Mdm2 podem refletir na proliferação maligna dos carcinomas estudados e a co-expressão de ambas pode ser útil na avaliação do prognóstico em pacientes com carcinoma de pâncreas.

A mutação do gene p53 foi encontrada em carcinomas queratinizantes típicos e lesões ou desordens precursoras com elevado risco de cancerização, sendo a mutação um evento que ocorre no início da carcinogênese e pode tornar-se um marcador útil, especialmente em lesões com aumentado risco transformação maligna (HANTSCHMANN et al., 2005).

Wang et al. (2005), estudaram a superexpressão do P53 selvagem e a correlação desta com alterações no Mdm2 e P14 em carcinoma de pulmão. Pôde-se demonstrar uma reduzida freqüência de mutação do P53 e a superexpressão da proteína, a qual reflete a estabilização da proteína na ausência de mutação do gene. Logo, foi investigada a possibilidade de um mecanismo alternativo para a estabilização do P53. Em 95% dos tumores que apresentam superexpressão do P53 selvagem, houve ausência de marcação para o Mdm2, com alta concordância de perda de função do Akt e baixa expressão do RNAm Mdm2. Os resultados também mostraram que entre os tumores P53 positivos, 92% apresentaram imunoreatividade para o P14. A imunopositividade do P14 unida a baixa expressão do Mdm2, contribui

para o acúmulo do P53 selvagem. Os autores concluíram que a desregulação da via P53-Mdm2-P14 é importante na patogênese do câncer de pulmão.

Através da análise imunoistoquímica das proteínas P53 e Mdm2 em neuroblastomas, Slack et al. (2005) observaram a forte expressão do Mdm2 nestas lesões. Os autores concluíram que o Mdm2 representa um importante papel na tumorigênese desta lesões e sustentaram a hipótese de inibição da interação Mdm2-P53 por pequenas moléculas ou outros meios, com objetivo de aumentar a atividade do p53 e a morte celular, na possível estratégia terapêutica futura em neuroblastoma *de novo*.

Com objetivo de estudar a via do p53 em hemangiopericitomas meníngeos, Martinez et al. (2005), analisaram as proteínas Mdm2, P21 e P53, através de imunistoquímica e imunofluorescência duplas, em hemangiopericitomas primários e recorrentes. Foram observadas expressões simultâneas das proteínas P53, P21 e Mdm2 em todos os casos. Considerando que as transativações dos produtos dos genes p21 e mdm2 são alcançadas pela função normal do gene p53 selvagem, estes resultados sugerem a ausência de mutação no gene p53, nos casos estudados. Em 55,5% das lesões foram observadas a superexpressão da proteína Mdm2, sugerindo-se o possível papel desta proteína na patogênese. Além disso, a co-localização das proteína P53/Mdm2 foi freqüentemente observada pela técnica de imunofluorescência dupla. Logo, foi sugerido que a Mdm2 uni-se ao P53 inativando-o através de um mecanismo diferente da mutação.

Vestey et al. (2005) estudaram a expressão do Akt em 88 carcinomas de mama e a correlação com a expressão do P53 e Mdm2 através da imunoistoquímica. A expressão do P53 nuclear foi detectada em 25 casos e a expressão citoplasmática em 22 casos estudados. Não houve expressão de P53

na maioria dos carcinomas invasivos. A expressão do Mdm2 foi observada em 40 carcinomas analisados, com a mesma proporção de marcação nuclear e citoplasmática. O Akt apresentou expressão (citoplasmática) em 77 carcinomas. Os resultados da análise estatística demonstraram que a ativação do Akt estava significativamente associada a expressão citoplasmática do P53. Não houve associação entre a expressão do Akt e a expressão nuclear ou citoplasmática do Mdm2. Baseados nestes resultados os autores concluíram que o Akt representa um importante papel no crescimento tumoral através do mecanismo de inativação do p53 que envolve também o Mdm2. Segundo os autores, uma via alternativa, a qual o Akt regula o p53, pode envolver esta localização citoplasmática.

Dworakowska et al. (2005) estudaram 50 casos de carcinomas de pulmão que não de células pequenas, com o intuito de investigar a importância do índice de apoptose considerado sozinho ou associado à expressão de proteínas que controlam a fase G1 do ciclo celular (P53, MDM2, PRb e P21), através das técnicas de TUNEL e imunoistoquímica. O índice de apoptose não estava relacionado com a expressão das proteínas P53, P21 ou Prb, porém foi demonstrado que o menor índice de apoptose estava associado aos casos que apresentaram superexpressão do Mdm2.

Angèle et al. (2006), analisaram a expressão de proteínas envolvidas na parada do ciclo e reparação do DNA danificado, em compartimentos luminais e mioepiteliais de lesões benignas e malignas de carcinomas de mama, com diferenciação mioepitelial. Obtiveram como um dos resultados a ausência de marcação do P53 em lesões benignas e a superexpressão em 8 de 18 tumores malignos. Segundo os autores, os tumores mioepiteliais malignos, freqüentemente,

expressam a proteína P53. Os resultados da pesquisa sugerem diferentes capacidades de reparo do DNA lesado, nos dois diferentes tipos celulares.

Agrawal et al. (2006), ao realizarem uma revisão de estudos sobre a regulação da via que envolve o Mdm2 e o P53 em câncer de mama, sugeriram que o tratamento efetivo para o carcinoma de mama pode ser descoberto se todo o mecanismo que envolve estas proteínas, for elucidado. Esta via mostrou esperança desde a descoberta das freqüentes mutações do P53 associadas a diversos cânceres humanos. Os fatores de prognóstico podem torna-se eficazes no tratamento de diversos tumores, se o caminho dos supressores puder ser prevenido de ativadores que anulam os efeitos dos supressores.

2.5 P53, Mdm2, P21e Pakt – Expressão e interação em neoplasias de glândulas salivares

Algumas pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de estudar o comportamento, desenvolver um marcador de prognóstico e avaliar a participação de proteínas na intricada tumorigênese das neoplasias de glândula salivar.

Com objetivo de investigar a presença da oncoproteína P53 aberrante em tumores benignos e malignos de glândula parótida, Gallo et al. (1995), averiguaram a expressão desta proteína e correlacionaram-as com os dados clínicos. O P53 foi detectado em 11% das lesões benignas e em 67% das malignas. Dentre os tumores benignos positivos, 2 eram adenomas pleomórficos e 1 adenoma de células basais. A marcação foi restrita a poucos núcleos da lesão avaliada. Em tumores malignos

houve marcação que variava de negativa a alta. O grupo controle (glândula normal adjacente) foi negativo em todos os casos. Através da correlação clínica, os dados sugerem que a expressão moderada e alta nos carcinomas de glândula parótida, apresentaram maior grau de agressividade e pior prognóstico.

Através do estudo da expressão da proteína P53 em carcinomas ex-adenomas pleomórficos, Rosa et al. (1996) pela técnica de imunoistoquímica, demonstraram que havia expressão da P53 em áreas de alto grau de malignidade, enquanto que em áreas de baixo grau de malignidade e nos componentes benignos da lesão, não havia expressão da mesma. As áreas negativas apresentaram um fenótipo de célula mioepiteliais. Baseados nos resultados acima descritos, os mesmos autores em 1997, estudaram 133 casos de lesões benignas, sendo estas adenoma pleomórfico e mioepitelioma (96 casos de lesões primárias e 37 de recorrentes), com objetivo de avaliar a expressão da P53 nestas lesões. Ao realizar a análise imunoistoquímica, observaram o acúmulo da proteína P53 em 1 caso de adenoma pleomórfico primário e 1 caso recorrente, logo concluíram que a P53 não constitui um biomarcador de risco de recorrência nestas lesões.

Karja et al. (1997) avaliaram expressão imunoistoquímica da proteína P53 mutante e selvagem, e a presença de mutações através da técnica da PCR-SSCP. Dentre os tumores benignos havia 96 adenomas pleomórficos e 1 mioepitelioma. O adenoma pleomórfico foi a lesão benigna que apresentou maior prevalência de imunoreatividade para o P53, com 41% de casos positivos (>10%), sendo o mioepitelioma negativo para o mesmo. Com relação as mutações, foi encontrado padrão sugestivo de mutação em 2 dos 6 casos positivos avaliados (no exon 8/9 e 6) e em nenhum dos 4 casos negativos avaliados. Relacionando os resultados com os

dados clínicos, o acúmulo da proteína não representou um fator prognóstico em tumores benignos ou malignos de glândula salivar.

Um estudo realizado por Nagao et al. (1998a, 1998b), comparou os padrões imunohistoquímicos de algumas proteínas incluindo a p53, em adenocarcinoma de células basais e adenomas de células basais. Os resultados mostraram marcação moderada ou forte da proteína P53 limitada aos tumores malignos, concluindo que a P53 pode ser um fator importante na transformação maligna. Os mesmos autores realizaram um estudo com intuito avaliar a expressão da P53 em mioepiteliomas malignos. Os autores observaram que houve a expressão da P53 em 5/10 casos estudados, nos quais 4 (P53+) apresentaram recorrência ou foram fatais. Logo, concluíram que a expressão da P53 em mioepiteliomas malignos estavam correlacionados a um pobre prognóstico.

Em glândula salivar, muito tem sido pesquisado a respeito de mutações gênicas relacionadas com a tumorigênese principalmente do gene p53, porém alguns estudos mostram ausência de mutação desse gene e marcação expressiva para a Mdm2, indicando um mecanismo alternativo na tumorigênese dessas neoplasias (ARAÚJO et al., 2000a). Da mesma forma que Leach, Modali e Boukkamp, (1993) encontraram o mesmo resultado em sarcomas de tecido mole.

Nordkvist et al. (2000), estudaram a expressão e a mutação do p53 em uma série de 68 tumores benignos (adenomas pleomórficos) e 237 tumores malignos de glândula salivar. A análise imunoistoquímica demonstrou superexpressão do P53 (>10%) em 20% dos tumores malignos, com maior prevalência encontrada nos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau, carcinomas epidermóides, e nos carcinomas ex-adenomas pleomórficos, e baixa prevalência nos carcinomas adenóides císticos e carcinomas de células acinares. No entanto, nenhum dos 68

tumores benignos apresentaram marcação superior a 10%. A análise do sequenciamento de nucleotídeos e a análise do polimorfismo de fita única de DNA (SSCP) dos exons 5 a 9 do gene p53, revelou 9 mutações em 7 tumores malignos analisados. Os autores concluíram que o p53 pode ser útil como marcador usado para discriminar entre um tumor maligno e benigno de glândula salivar.

Lewis, Olsen e Sebo (2001) analisaram através da imunoistoquímica e estudo do DNA por análise da imagem digital, 73 casos de carcinomas ex-adenomas pleomórficos, correlacionando com os dados clínicos. Dentre as proteínas estudadas estava a P53, a qual apresentou expressão em 41% dos casos. A positividade para o P53 estava associada com o tamanho maior do tumor, o alto grau histológico, a maior extensão de invasão e a presença de ductos salivares. O conteúdo do DNA demonstrou que os componentes malignos foram aneuplóides em 88% dos casos, enquanto nas regiões de adenoma pleomórfico o conteúdo do DNA mostrou-se diplóide. Os autores concluíram que os fatores prognósticos significantivos incluíram o estágio do tumor, o grau histológico, a maior proporção de áreas carcinomatosas, a extensão de invasão e o índice de proliferação.

Scholtz et al. (2001) realizaram um estudo com a finalidade de obter a análise genética da oncoproteína Mdm2 humana em tumores benignos (6 adenoma pleomórficos e 3 tumores de Warthin) e malignos (1 adenocarcinoma, 1 adenocarcinoma de células basais, 1 carcinoma mucoepidermóide 2 carcinomas adenóides císticos, 3 carcinomas de células acinares e 1 carcinoma epidermóide) de glândula salivar. Para o estudo foram utilizadas as técnicas de PCR semi-quantitativo para analisar a superexpressão do gene mdm2, o RT-PCR para detecção das combinações variantes, amplificação da sequência da porção C-terminal do mdm2, sequenciamento dos fragmentos do PCR e análise

imunoistoquímica da proteína Mdm2. A análise dos resultados do PCR não demonstrou evidências de amplificações do gene *mdm2* nos tumores benignos e malignos estudado, da mesma forma que a análise do sequenciamento dos fragmentos de PCR, também não revelaram alterações. Porém ao investigar os transcritos do RNAm do *mdm2*, 4 tumores (1 adenoma pleomórfico primário, 1 recorrente, 1 adenocarcinoma e carcinoma mucoepidermóide) apresentaram combinações variantes. Foi detectado perda e nucleotídeos (exons 8 a 11) nas lesões de adenoma pleomórfico primário, adenocarcinoma, e carcinoma mucoepidermóide, e deleção de nucleotídeo no adenoma pleomórfico recorrente. O experimento demonstrou que não havia um padrão uniforme de síntese de RNAm, pois apresentaram valores que variavam de 1×10^2 moléculas de RNAm/ 10ng RNA celular, em tumores benignos, a 1×10^4 em adenocarcinoma. Ao correlacionar a expressão imunoistoquímica com os dados genéticos, não foi observada relação entre os níveis de RNAm e da proteína Mdm2, nos vários tipos de tumores estudados. Segundo os autores estes resultados podem apresentar aplicações clínicas, como exemplo, relataram que a combinação variante do RNAm *mdm2* freqüentemente foi encontrada em tumores malignos e que a detecção de uma forma nova de combinação variante, encontrada em 2 casos de adenomas pleomórficos, pode indicar um maior potencial de transformação maligna dos mesmos. Com este estudo os autores concluíram que a expressão do *mdm2* foi detectada em tumores malignos (nos casos estudados) e que o acúmulo do Mdm2 não foi causado por alterações genéticas. Nos adenoma pleomórficos a expressão da proteína foi baixa. Logo foi sugerido que os níveis de *mdm2* em tumores de glândula salivar podem ser modulados por mecanismos independentes da quantidade de RNAm do *mdm2*.

Alves et al. (2002) estudaram 60 casos de adenomas pleomórficos, com objetivo de investigar a expressão do P53 através da técnica de imunohistoquímica. A análise dos resultados demonstrou expressão negativa em todos os casos avaliados, porém com pouca marcação (<1%) em 11 tumores.

Através da análise imunohistoquímica para o P53, Ohtaké et al. (2002), estudaram 101 casos de adenomas pleomórficos, com objetivo de detectar focos pré-cancerígenos. Histologicamente foram encontradas células tumorais atípicas em 51% dos casos avaliados, sendo 6% com atipias focais, 15% esporádicas e 30% singulares. A marcação imunohistoquímica foi positiva para a maioria das células atípicas. Logo, os autores concluíram que as células atípicas com marcação nuclear podem ser consideradas células em estado pré-cancerígeno, sugerindo o estudo de outros oncogenes como o *râs*, P21, c-myc e *erbB2*, para melhor compreensão do potencial destas células.

Rojer et al. (2002) estudaram um carcinoma ex adenoma pleomórfico com o objetivo de identificar eventos genéticos que levam à translocação, deleção, amplificação e superexpressão do gene *mdm2*, nesta lesão. Os autores demonstraram que a lesão apresentou um cariótipo pseudodiploide com *del*(5)(q22-23q32-33) e um *t*(10;12)(p15;q14-15). Através da análise citogenética, foram observados muitos cromossomos com “*double minute*” (*dmin*) ou regiões homogeneamente marcadas (*hsr*). A análise detalhada das células *dmin* e *hsr* revelou que o *mdm2* estava com o *der*(10) deletado e que *dmin* e *hsr* estavam positivos para o gene. A análise do Southern Blot confirmou que o *mdm2* estava amplificado e que não ocorreram rearranjos brutos do gene. Esses resultados sugerem que a amplificação e a possível super expressão do *mdm2* parece ser

evento genético importante que pode contribuir para a transformação maligna do adenoma pleomórfico.

Hoque et al. (2002) examinaram a expressão do RNAm dos genes p33, p14ARF e p21WAF1 em 28 carcinomas epidermóides orais, 14 adenomas pleomórficos e em 8 tumores malignos de glândula salivar, com o objetivo de avaliar e relacionar os níveis de p33 e p14 com os dados do p21 nos tumores estudados e os níveis de P14 como status do P53 em carcinoma epidermóide oral. Através das técnicas de RT-PCR para p33, p14 e p21, e análise de imunoistoquímica para a P53, esta última apenas em carcinomas epidermóides. Os 13/14 adenoma estudados expressaram RNAm p14, enquanto apenas 1/8 tumores malignos expressou. Com relação ao p21, 8/14 adenomas e 7/8 tumores malignos de glândula expressaram RNAm p21. Ao relacionar os resultados obtidos, os autores relataram não haver correlação da expressão do p14 com o p21 em tumores de glândula salivar, porém ao analisar os resultados da imunoistoquímica nos carcinomas epidermóides, os autores sugeriram que o P14 pode regular a expressão do gene p21 de maneira independente do gene p53. O grupo controle (células epiteliais gengivais) apresentou expressão do RNAm p21 e não do RNAm p14.

Weber et al. (2002) avaliaram 42 adenomas pleomórficos de glândula parótida, através de PCR, análise seqüencial do DNA, expressão do RNAm, análise microsatélite e imunoistoquímica, a fim de investigar o papel da via do P53 no desenvolvimento de adenomas pleomórficos através do estudo de alterações do p14^{ARF}, p16^{INK4a}, P53 e PRb nestas lesões. Foi demonstrado metilação do p14^{ARF} em 1 dos 42 casos e no p16^{INK4a} em 12 dos 42 adenomas pleomórficos, que estavam correlacionados com a perda de transcrição do RNAm. A metilação foi encontrada apenas nos componentes epitelial e transicional e mutações do p53 foram

detectadas em 4 dos 42 adenomas, apenas nos componentes epiteliais das lesões. No grupo controle (tecido de parótida normal), não foram observadas alterações de p14^{ARF}, p16^{INK4a}, P53 e PRb. Os autores concluíram que alterações do p14^{ARF} e p16^{INK4a}, e também mutações no p53, ocorreram exclusivamente nos componentes epiteliais e transicionais do adenoma pleomórfico confirmando a hipótese de que essas áreas são sujeitas a transformação maligna.

Mantesso et al. (2003) realizaram uma análise do carcinoma epitelial-mioepitelial baseados no estabelecimento de uma nova linhagem celular. Através das técnicas de imunoistoquímica e imunofluorescência, os autores demonstraram o padrão de marcação dos dois diferentes tipos celulares encontrados no carcinoma estudado. Dentre as proteínas estudadas, estava a P53, a qual apresentou marcação apenas nas células do tipo epitelial da lesão e não houve marcação nas células do tipo mioepitelial, indicando que as mudanças genéticas, nas duas populações celulares, são diferentes. Os autores relataram que os resultados encontrados indicam que a proliferação de células mioepiteliais não é devido a alterações no p53, mas provavelmente devido a alterações de outros genes responsáveis pelo controle da proliferação celular, sugerindo estudos de outros genes como o mdm2.

Outros estudos sugerem o envolvimento do gene mdm2 no desenvolvimento e/ou progressão tumoral em glândulas salivares. Mantesso et al. (2004) pesquisaram a expressão do RNAm 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-se das técnicas de PCR diferencial e imunofluorescência. A expressão do mdm2 estava pouco ou moderadamente aumentada nas linhagens de adenoma pleomórfico, e nenhum aumento da

expressão do RNAm do gene mdm2 foi demonstrada na linhagem de mioepitelioma. Todas as linhagens de neoplasias benignas de glândulas salivares analisadas apresentaram fraca positividade para a proteína P21 combinada com negatividade para a proteína P53.

Alves et al. (2004) ao comparar a expressão do P53 em adenomas pleomórficos e tumores malignos de glândulas salivares (carcinoma adenóide cístico e carcinoma mucoepidermóide) através da imunoistoquímica, verificaram a ausência de expressão nos adenomas pleomórficos, a baixa expressão nos carcinomas adenóides císticos (20%) e a moderada expressão no carcinoma mucoepidermóide (53%), indicando um alto-grau de malignidade, neste último.

Freitas et al. (2005), analisaram a marcação imunoistoquímica da P53 em adenomas pleomórficos e em carcinomas ex-adenomas pleomórficos em fase precoce de transformação maligna, com o objetivo de desenvolver marcadores para o diagnóstico. Em todos os casos de carcinomas ex-adenomas pleomórficos, houve marcação de P53 nas células luminais das áreas benignas e principalmente das malignas. Poucas células mioepiteliais benignas foram positivas para P53. Foi sugerido que a P53 pode estar envolvida num estágio precoce de malignização do adenoma pleomórfico.

Matizonkas-Antonio et al. (2005) avaliaram mutação do gene p53 em neoplasias de glândula salivar, através da técnica de PCR. Em 2/5 adenomas pleomórficos foram encontradas mutações nos exons 5 e 8, enquanto 2/2 carcinomas ex-adenoma pleomórficos também apresentaram mutações. Os autores concluíram que a alta prevalência de mutação nos carcinomas ex-adenomas, comparada as mutações nos adenomas pleomórficos, sugere que o p53 representa um importante papel na oncogênese dos carcinomas ex-adenomas. E talvez,

mutações encontradas nos adenomas pleomórficos podem representar progressão do tumor e podem implicar em grande chance de transformação maligna. Logo, diferentes mecanismos podem estar envolvidos na patogênese dos adenomas pleomórficos, incluindo a inativação do p53, independente de mutação.

Affolter et al. (2005) realizaram um estudo com o objetivo de demonstrar e comparar a expressão do P21 e P53 em tumores benignos e malignos de glândula salivar e seios paranasais, através das técnicas de imunistoquímica convencional (IHC), para a proteína P21 e imunistoquímica amplificada para sinal de tiramidina (TSA-IHC) para a P21 e P53. Ao avaliar o grupo controle (glândula salivar e mucosa sinusal normal), foi demonstrado uma pequena quantidade da proteína P21, desta forma, a técnica TSA-IHC permitiu a discriminação entre a expressão normal e a expressão reduzida ou ausente da proteína. O adenoma pleomórfico apresentou expressão da P21 em 26/30 casos (86.7%), enquanto pela técnica convencional apenas 1/30 casos (3.33%) mostrou-se positivo. Em relação ao P53, 60% dos casos não apresentaram marcação para esta proteína. Segundo os autores, o mecanismo pelo qual o organismo permite que haja a proliferação celular, mesmo com o acúmulo do P21, permanece obscuro.

Ao investigar o envolvimento do gene p53 na tumorigênese e progressão dos adenomas pleomórficos, através da técnica de SSCP, Augello et al. (2006), avaliaram a mutação nos exons 5-8 e identificaram 8 alterações em 28 (28%) dos adenomas pleomórficos estudados, sendo 25% no exon 5, 50% no exon 6, 25% no exon 7 e nenhuma alteração no exon 8. Nos casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico, foram identificadas 4 mutações no p53 em 5 casos estudados, tendo ocorrido 50% no exon 5, 25% no exon 6 e 25% no exon 7. Baseados nos resultados adquiridos, os autores concluíram que os tumores,

provavelmente provenientes de adenomas pleomórficos, foram caracterizados pela alta taxa de mutação no gene p53.

Através de estudos imunoistoquímicos, McCluggage, Primrose e Toner (2006), avaliaram a expressão da proteína P53 em um caso de carcinoma mioepitelial de glândula parótida, originado de um adenoma pleomórfico prévio, o qual apresentou uma recorrência, antes do diagnóstico de carcinoma. O estudo demonstrou que um grande número de núcleos celulares no carcinoma mioepitelial apresentou marcação para o anticorpo anti-P53 (DO-7) na primeira ressecção (adenoma pleomórfico primário), e na segunda (adenoma pleomórfico recorrente), as áreas epiteliais não apresentaram marcação, mas houve marcação focal nas áreas onde havia predominância de células mioepiteliais. Logo foi sugerido que a inativação da P53, talvez por mutação, possa ter desempenhado um papel importante no desenvolvimento da malignidade mioepitelial, no caso estudado.

De acordo com o acima exposto, existe alteração e interação das proteínas objeto desse estudo em uma gama variada de neoplasias humanas. e, embora essa interação seja freqüentemente estudada em neoplasias malignas, estudos pregressos já demonstraram alteração dos seus níveis de expressão isoladamente ou em conjunto, em neoplasias benignas, incluindo casos em mama e glândula salivar.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem como objetivo estudar as proteínas Mdm2, P53, P21 e Akt em neoplasias benignas de glândula salivar, utilizando as técnicas de imunohistoquímica, 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 (Anexo A)

4.1 Casuística

Para as reações de imunoistoquímica foram utilizados casos selecionados do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo-USP e do Hospital do Câncer A.C. Camargo, sendo estes obtidos de biópsias de lesões bucais de glândulas salivares. Foram utilizados 10 casos de adenoma pleomórfico e 6 casos de mioepitelioma. A localização e o diagnóstico estão descritos na Tabela 4.1

Cortes corados em Hematoxilina e Eosina das neoplasias supracitadas foram submetidos a um estudo morfológico em microscopia de luz, realizado por três patologistas experientes para confirmação do diagnóstico.

Tabela 4.1 - Localização das neoplasias de glândula salivar

Caso	Neoplasia	Localização
1	Mioepitelioma	Palato
2	Mioepitelioma	Parótida
3	Mioepitelioma	Palato
4	Mioepitelioma	Palato
5	Mioepitelioma	Parótida
6	Mioepitelioma	Parótida
7	Adenoma Pleomórfico	Mucosa jugal
8	Adenoma Pleomórfico	Palato
9	Adenoma Pleomórfico	Parótida
10	Adenoma Pleomórfico	Mucosa jugal
11	Adenoma Pleomórfico	Palato
12	Adenoma Pleomórfico	Glândula submandibular
13	Adenoma Pleomórfico	Mucosa jugal
14	Adenoma Pleomórfico	Mucosa jugal
15	Adenoma Pleomórfico	Palato
16	Adenoma Pleomórfico	Lábio superior

Para as reações de western blotting e imunofluorescência foram utilizadas linhagens celulares derivadas de: Mioepitelioma (M1), Adenoma Pleomórfico (AP4) (Tabela 4.2). Essas linhagens foram previamente estabelecidas no Laboratório de cultivo celular da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 4.2 - Relação das linhagens de neoplasias de glândula salivar

Linhagem	Neoplasia	Glândula de origem
AP4	Adenoma Pleomórfico	Palato
M1	Mioepitelioma	Palato

4.2 Técnica de Imunoistoquímica

A expressão imunoistoquímica das proteínas P53, Mdm2, P21^{WAF} e pAkt foi obtida através da técnica da streptavidina-biotina. Os cortes fixados em formalina a 10% foram seccionados com a espessura de 3 µm 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 a desparafinização em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente por 20 minutos. Os cortes foram reidratados em série descendente de etanóis, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguido 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 lavagem em água corrente e água destilada e as lâminas seguiram para os tratamentos de recuperação antigênica.

A recuperação antigênica das proteínas Mdm2, P21^{WAF1} e pAkt foi realizada com ácido cítrico (10mM, pH 6.0) em banho-maria a 95°C durante 30 minutos. Em

seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, seguidas por 2 banhos em água deionizada.

A recuperação antigênica da proteína P53 foi realizada com solução de EDTA (1mM, pH 8.0) em banho-maria a 95°C durante 30 minutos.

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, foi realizado tamponamento com 3 banhos de 5 minutos em solução de Tris pH 7,4.

As concentrações e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados foram ilustrados na Tabela 4.3. As reações para os anticorpos P53, MDM2 e pAKT foram realizadas na máquina DAKO Autostainer, e manualmente para o anticorpo P21^{WAF1}.

Tabela 4.3 - Imunoistoquímica : anticorpos, concentração e tempo de incubação

Soro	Tipo	[]	Procedência	Clones	Incubação
P53	Monoclonal	1:50	DAKO	DO-7	40 min
MDM2	Monoclonal	1:40	Novocastra	SMP14	40 min
Pakt	Policlonal	1:25	Santa Cruz Biotechnology	Ser-473-R	40 min
P21 ^{WAF1}	Monoclonal	1:30	DAKO	SX118	18 horas

Após a incubação dos anticorpos primários, foi feito o 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 realizou-se a lavagem em TBST pH 7,6 (2 banhos). Para a reação de revelação utilizou-se o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St

Louis, MO/USA). Após a lavagem, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer. Posteriormente, todos os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafanizados em 3 banhos de xilol e montados em resina Permout (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA), para exame ao microscópio de luz.

Foram utilizados como controle positivo para a MDM2 o osteossarcoma; e para P53, P21^{WAF1} e pAKT carcinoma epidermóide de boca. Para o controle negativo foram utilizados cortes em blocos de parafina que continha glândula salivar normal. Como controle negativo da reação, foi omitida a incubação do anticorpo primário.

Após a montagem, realizou-se a contagem de mil células em cada caso estudado, através da escolha de campos aleatórios em regiões mais representativas da lesão. A análise estatística foi realizada através do método de Mann-Whitney utilizando um nível de significância de 5%, com a finalidade de se comparar a número de células positivas nas lesões neoplásicas e nas glândulas salivares normais estudadas.

4.3 Técnica de Cultivo Celular

Todos os procedimentos do cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo 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), 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, dentro de um período máximo de 24 horas, para que os efeitos citotóxicos do di-metil sulfoxido (DMSO-Sigma) não produzam 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, mas não ultrapassando 3 dias consecutivos. 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, Oberkochen, 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, em temperatura de 37° C. Meio de cultura 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 Técnica de Western Blotting

Para o estudo da interação entre as proteínas, foi realizada a extração das proteínas das células cultivadas. Após a sub-confluência (75% 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 aliquoteado e estocado a -80 °C.

Quantificou-se as proteínas dos lisados através do método do ácido biocinconinico (BCA Protein Assay Reagent Kit – Pierce) que tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre resultando na redução do mesmo, formando 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 descritas a seguir.

A mesma quantidade de proteínas totais foi utilizada para os grupos estudados, o que permitiu posterior análise da porcentagem em que cada proteína de interesse se apresenta 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 e sódio (SDS), 150 mM tris pH 6,8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol.

Em seguida, aplicou-se 20 µg de proteína por canaleta, as quais 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. Utilizou-se o padrão de peso molecular Kaleidoscope (BioRad, Hercules, Califórnia, USA).

Tabela 4.4 - Gel 10% acrilamida com SDS (10X16 cm)

	Gel de separação	Gel de empilhamento
	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 (Amersham) 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 e utilizada uma voltagem de 30 mA por 120 minutos. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio.

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 over-night em geladeira. No caso do anticorpo pAkt, a solução de bloqueio utilizada foi o 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 em solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST foi incubado durante 60 minutos

em temperatura ambiente sob agitação (Tabela 4.5). Após o período de incubação, realizaram-se 3 lavagens de 10 minutos com TBST para remoção do anticorpo não absorvido, sob agitação e em temperatura ambiente. O anticorpo secundário (conjugado com peroxidase) 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
P21 ^{WAF1}	Monoclonal	1:250	DAKO	SX 118	60 minutos
pAKT	Policlonal	1:250	Santa Cruz Biotechnology	Ser 473-R	60 minutos

A revelação da reação foi realizada pelo método colorimétrico, através da utilização do kit Opti 4CN (Bio-Rad). Uma parte do diluente concentrado Opti-4CN foi adicionado 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, e colocou-se 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 produziu uma coloração enegrecida nas bandas positivas para o anticorpo primário de interesse.

Como controles positivos da proteína Mdm2 foram utilizadas as linhagens SJSA1 (osteossarcoma), a qual apresenta amplificação do mdm2; para a proteína

P53 utilizou-se a Hacat (queratinócito imortalizado), pois a mesma apresenta P53 mutante; para as proteínas P21 e pAkt, foi utilizada a linhagem HN6 (carcinoma epidermóide de boca), a qual demonstra superexpressão para estas duas proteínas (LEHMAN et al., 1993; LONGHi et al., 2001; AMORNPHEMALTHAN et al., 2004; NEMES et al., 2005).

Como controle da quantidade total de proteínas colocada em cada canaleta, foi realizada a reação com o anticorpo anti β -actina, pois o mesmo representa uma proteína estrutural presente em todas as linhagens celulares.

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 o programa 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. O experimento foi realizado em triplicata.

Os valores em triplicata obtidos da análise densitométrica das bandas do western blotting foram avaliados através do programa BioEstat 4.0. Os valores em triplicata foram analisados estatisticamente através do método t de student ou método de Mann-Whitney .

4.5 Técnica de Imunofluorescência

As linhagens AP4 e M1 foram submetidas à reação de imunofluorescência com os anticorpos contra as proteínas P53, MDM2, P21^{WAF1} e pAKT.

Para esta técnica, as 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 quatro novas lavagens em PBS.

Os anticorpos primários foram diluídos em PBS + BSA a 1% nas concentrações e tempo de incubação descritos na Tabela 4.6. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas novamente com PBS.

Tabela 4.6 - 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
MDM2	Monoclonal	1:25	Santa-Cruz Biotechnology	SMP14	60 minutos
P21 ^{WAF1}	Monoclonal	1:40	DAKO	SX118	60 minutos
pAkt	Policlonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology	Ser 473-R	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, 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 expressão, à localização e ao padrão da marcação.

5 RESULTADOS

Com finalidade didática os resultados foram divididos em quatro partes:

- 5.1) Expressão imunoistoquímica das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt;
- 5.2) Quantificação das proteínas através da técnica de Western Blotting;
- 5.3) Imunoexpressão e localização das proteínas através da técnica de Imunofluorescência;

5.1 Expressão imunoistoquímica das proteína P53, Mdm2, P21 e Pakt

Realizou-se a análise da expressão imunoistoquímica das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt nos grupos dos adenomas pleomórficos e mioepiteliomas em comparação com o grupo das glândulas salivares normais. Os resultados obtidos estão representados na Tabelas 5.1 e nas Figuras 5.1 e 5.2.

A proteína P53 mostrou-se negativa tanto nas glândulas salivares normais quanto nos tumores, sendo consideradas positivas as marcações iguais ou superiores a 5% de células. Em alguns casos de adenoma pleomórfico, houve presença de raras células marcadas, sendo estas localizadas nas regiões não lumbais e próximas a metaplasias. De acordo com a análise estatística, a P53 não demonstrou diferenças significativas ($p < 0.05$) em relação a marcação das glândulas normais, tanto nos adenoma pleomórficos quanto nos mioepiteliomas.

A proteína Mdm2 apresentou expressiva marcação no grupo dos adenomas pleomórficos (Figura 5.1), variando de 21.1% a 56.8% , com desvio padrão igual a 108.35 e mediana igual a 31%. A mesma tendência se repetiu quando da análise da expressão da Mdm2 nos mioepiteliomas (Figura 5.2). Nas glândulas salivares normais não houve marcação.

A proteína P21, de modo geral, não apresentou marcação significativa (>5%) em nenhum dos grupos estudado. Nos adenomas pleomórficos o maior percentual de células marcadas foi de 2.9%. Em 2 adenomas pleomórficos e 3 mioepiteliomas, houve marcação de poucas células em áreas focais, porém não foram representativas na contagem das células devido a escolha aleatória dos campos contados.

A análise da expressão da pAkt demonstrou variada marcação para ambas as lesões estudadas, com percentual maior nos mioepiteliomas. Nos adenomas pleomórficos a expressão da pAkt variou de 0 a 15.1%, com mediana de 6.7% (desvio padrão = 50.3). Os mioepiteliomas demonstraram expressão variando de 13.4 a 67.5%. Não houve marcação nas glândulas salivares normais.

Diante de tais resultados, pôde-se constatar a existência de diferenças estatisticamente significativas na expressão das proteínas Mdm2 e pAkt ($p < 0.05$) em relação as glândulas normais. Não havendo diferença significativa quando foi feita a comparação das expressões das proteínas P53 e P21 com as glândulas normais. Esses resultados encontram-se explicitados nas Tabelas 5.2 e 5.3.

Embora, para efeito de contagem tenham sido consideradas positivas exclusivamente as células que exibiam marcação nuclear, observou-se casualmente a expressão citoplasmática da proteína Mdm2, sendo mais freqüente na análise da proteína Akt.

Tabela 5.1 - Percentual da expressão imunoistoquímica das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt em adenomas pleomórficos , mioepitelioma e glândulas salivares normais

Nº	Caso	P53 (%)	Mdm2 (%)	P21 (%)	pAkt
1	Mioepitelioma	0.3	38.4	0	38.3
2	Mioepitelioma	0.3	36.8	0.2	67.5
3	Mioepitelioma	0	27.4	0	28.9
4	Mioepitelioma	0.1	38.6	0.3	30.5
5	Mioepitelioma	0.2	55.8	0.2	18.5
6	Mioepitelioma	0.1	32.2	0	13.4
7	A P	0.5	35.84	0	15.1
8	A P	0	23.4	0	8.3
9	A P	0	22.3	0	2.9
10	A P	0	56.8	0	6.4
11	A P	0.1	42.6	2.9	7.0
12	A P	0	28.4	0	10.4
13	A P	0	29.2	0	7.5
14	A P	0	35.6	0	0
15	A P	0	32.8	0	0
16	A P	0	21.1	0	0
17	Glândula normal	0	0	0	0
18	Glândula normal	0	0	0	0
19	Glândula normal	0	0	0	0
20	Glândula normal	0	0	0	0

Tabela 5.2 - Análise comparativa da expressão imunoistoquímica das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt entre adenomas pleomórficos e glândulas salivares normais

Variável	Categorias	Adenoma pleomórfico	Glândula Normal	p*
P53	Min-Máx	0-5	0	0.3961
	Mediana	0	0	
	Desvio padrão	1.56	0	
Mdm2	Min-Máx	211-568	0	0.004
	Mediana	310	0	
	Desvio padrão	108.35	0	
P21	Min-Máx	0-29	0	0.7773
	Mediana	0	0	
	Desvio padrão	9.77	0	
pakt	Min-Máx	0-151	0	0.0477
	Mediana	67	0	
	Desvio padrão	50.32	0	

*valor de p obtido pelo teste de Mann-Whitney

Tabela 5.3 - Análise comparativa da expressão imunoistoquímica das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt entre mioepiteliomas e glândulas salivares normais

Variável	Categorias	Mioepitelioma	Glândula Normal	p*
P53	Min-Máx	0-3	0	0.0881
	Mediana	1.5	0	
	Desvio padrão	1.37	0	
Mdm2	Min-Máx	274-558	0	0.012
	Mediana	376	0	
	Desvio padrão	96.39	0	
P21	Min-Máx	0-3	0	0.2008
	Mediana	1	0	
	Desvio padrão	1.32	0	
pAkt	Min-Máx	134-675	0	0.0105
	Mediana	297	0	
	Desvio padrão	191.60	0	

*valor de p obtido pelo teste de Mann-Whitney

Figura 5.1 - Expressão Imunoistoquímica em adenomas pleomórficos. A) H.E (aumento original = 200x); B) expressão da proteína P53; C) expressão da proteína Mdm2; D) expressão da proteína P21 e E) expressão da proteína pAkt (aumento original = 400x)

Figura 5.2 - Expressão Imunoistoquímica em mioepitelioma. A) H.E (aumento original = 200x); B) expressão da proteína P53; C) expressão da proteína Mdm2; D) expressão da proteína P21 e E) expressão da proteína pAkt (aumento original = 400x)

5.2 Quantificação das proteínas através técnica de Western Blotting

A técnica de western-blotting consistiu na separação por eletroforese dos lisados de células contendo a quantidade total de proteínas. As amostras protéicas utilizadas foram de 20 µg para cada linhagem (AP4, M1, Hacat, Sjsa1 e HN6). Assim, com quantidades totais idênticas, pudemos correlacionar a expressão das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt das linhagens estudadas entre si e com as linhagens controles. Os resultados obtidos no estudo estão demonstrados na Figura 3.

Foram considerados significantes os valores que apresentaram resultados semelhantes aos respectivos controles ($p > 0.05$).

Em relação a proteína P53, a linhagem AP4 apresentou pouca expressão e a linhagem M1 apresentou ausência de expressão. Segundo a análise estatística dos resultados em triplicata, as linhagens AP4 e M1 não apresentaram valores significativos de expressão, em relação ao a linhagem controle (Figuras 5.3 e 5.4).

A mesma tendência se repetiu quando da análise da expressão da proteína P21. Na linhagem AP4 houve tênue expressão da proteína P21 e ausência de expressão na linhagem M1, comparadas à linhagem controle utilizada, HN6 (Figuras 5.3 e 5.4). Desta forma, os resultados não representaram valores significativos também para a proteína P21.

A proteína Mdm2 apresentou altos níveis de expressão tanto na linhagem AP4 quanto na M1 (Figuras 5.3 e 5.4). Através da análise estatística pôde-se observar que as linhagens estudadas apresentaram valores semelhantes ao valor do controle, a linhagem SJSA proveniente de osteossarcoma, que apresenta

superexpressão para a proteína Mdm2. Logo, nas linhagens de adenoma pleomórfico (AP4) e mioepitelioma (M1) a proteína Mdm2 está superexpressa.

Por fim, as linhagens estudadas, tanto a AP4 quanto a M1, mostraram expressão positiva para a proteína pAkt, de forma semelhante à da linhagem controle utilizada, a HN6 (Figuras 5.3 e 5.4). Semelhante ao resultado do Mdm2, a pAkt apresentou valores estatisticamente significativos tanto na linhagem AP4 quanto na M1, quando comparados ao controle.

Os resultados na análise estatística estão descritos nas Tabelas 5.4 e 5.5.

Figura 5.3 - Expressão das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt, comparadas a expressão da β -actina nas linhagens AP4, M1 e nas linhagens controles

Figura 5.4 - 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

Tabela 5.4 - Análise estatística dos resultados obtidos pelas leituras das bandas (triplicatas), na linhagem de adenoma

	Adenoma Pleomórfico	Controle	p
P53	17686	22636	0.0009
Mdm2	28508	28603	0.8477
P21	5968	18050	0.001
pAkt	4798	4599	0.7768

valor de p obtido pelo teste de Mann-Whitney

Tabela 5.5 - Análise estatística dos resultados obtidos pelas leituras das bandas (triplicatas) na linhagem de mioepitelioma

	Mioepitelioma	Controle	p
P53	1541	22636	0.0001
Mdm2	24968	28603	0.0810
P21	0	18050	0.0495
pAkt	4391	4599	0.7696

valor de p obtido pelo teste de Mann-Whitney

5.3 Imunoexpressão e localização das proteínas através da técnica de Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência tiveram por objetivo esclarecer a localização intracelular das proteínas estudadas, visto que, a localização pode ser indicativa de sua função.

Os resultados obtidos no estudo da expressão das proteínas P53, Mdm2, P21 e pAkt estão listados na Tabela 5.6 e demonstrados na Figura 5.5.

A expressão da proteína P53 foi negativa nas duas linhagens estudadas.

A expressão de P21 foi positiva em uma pequena porcentagem de células dos tumores analisados (Figura 5.5).

Com relação a expressão das proteínas Mdm2 e pAkt, as duas linhagens estudadas apresentaram resultados semelhantes. As duas proteínas demonstraram marcação tanto nuclear quanto citoplasmática na maioria das células avaliadas, tanto na linhagem AP4 quanto na M1, exibindo marcação mais intensa no núcleo.

Figura 5.5 - Imunoexpressão de Mdm2, P21 e pAkt nas linhagens de AP4 e M1

1A - Imunoexpressão de Mdm2 na linhagem de AP4

1B - Imunoexpressão de P21 na linhagem de AP4

1C - Imunoexpressão de pAkt na linhagem de AP4

2A - Imunoexpressão de Mdm2 na linhagem de M1

2B - Imunoexpressão de P21 na linhagem de M1

2C - Imunoexpressão de pAkt na linhagem de M1

Tabela 5.6 - Expressão e localização das proteínas nos compartimentos celulares

LINHAGEM	MDM2	P53	P21	pAKT
AP4	+ NC	-	+N	+ NC
M1	+ NC	-	+N	+ NC

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

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo analisar a expressão das proteínas Mdm2, P53, P21 e Akt em neoplasias benignas de glândula salivar através de diferentes técnicas de investigação.

Várias pesquisas têm revelado a ocorrência de alterações do p53 em cânceres humanos, o que faz deste gene e seu produto, alvos importantes quando se pretende desvendar os mecanismos envolvidos na carcinogênese e na progressão das mais diversas neoplasias. Tem se demonstrado por exemplo, que na grande maioria dos casos que retêm a expressão da p53 selvagem a função desta proteína está severamente comprometida. Isto pode ocorrer por diversos motivos, entre eles o aumento da expressão e atividade dos seus reguladores negativos, e também pela perda de função de fatores capazes de promover direta ou indiretamente a ativação da p53 ou de seus efetores (TACHIBANA et al., 2004).

O principal regulador negativo do p53 é o gene mdm2, o qual encontra-se amplificado em aproximadamente 20% dos sarcomas de tecido mole. Outros tumores com freqüente amplificação do gene mdm2 são astrocitomas, tumores do esôfago, osteossarcomas e tumores de células germinativas testiculares (MOMAND; ZAMBETTI, 1997). Devido a esses achados, muitos estudos têm sido realizados na tentativa esclarecer, com maior precisão, a interação P53-Mdm2 nas diversas neoplasias.

A relação entre amplificação de mdm2 e a carcinogênese não ocorre livre de restrições. Em muitos casos onde foi encontrada amplificação do mdm2, apenas o gene foi examinado e raramente foram investigados os níveis de RNAm ou proteínas. Dessa forma, pode ocorrer uma estimativa errônea da contribuição da expressão desregulada do Mdm2 na tumorigênese. Embora em numerosos casos analisados a amplificação do gene foi acompanhada pela superexpressão da proteína (LEACH; TOKINO; MELTZER, 1993; MARCHETTI et al., 1995), a superexpressão da proteína sem a amplificação do gene também foi observada (LANDERS et al., 1994; MCCANN et al., 1995).

Em estudos prévios, Mantesso et al.(2004) demonstraram a superexpressão de RNAm Mdm2 em neoplasias de glândula salivar e sugeriram a participação deste gene na tumorigênese destas lesões. Segundo os autores, mais estudos devem ser realizados com a finalidade de elucidar o comportamento patofisiológico de Mdm2 nos tumores de glândula salivar, pois a expressão aumentada do RNAm de Mdm2 não significa necessariamente o aumento da expressão da proteína. O RNAm pode estar aumentado, porém sem a tradução total da proteína. E ainda há a possibilidade de a proteína estar sendo degradada por algum mecanismo, e nesse caso, quantidades excessivas de RNAm novamente não significam quantidades excessivas de proteína.

Tendo isso exposto, fica clara a necessidade do estudo da mdm2 em nível protéico, bem como de outras proteínas que interagem com a mesma. Sendo assim, as proteínas P53, P21 e Akt também foram analisadas. Para este fim, foram utilizadas as técnicas de imunoistoquímica para avaliar a presença de marcação e os tipos celulares envolvidos, a técnica de western blotting para quantificação das

proteínas e a técnica de imunofluorescência para demonstrar a localização intracelular das proteínas analisadas.

Desta forma, este estudo tem como objetivo delinear, ao menos em parte, o caminho da tumorigênese e/ou progressão tumoral nos adenomas pleomórficos e mioepiteliomas.

Muitos estudos foram desenvolvidos com intuito de investigar a expressão da proteína P53 em neoplasias, com objetivo de elucidar o trajeto da via do P53 ou mesmo, desenvolver um marcador para o diagnóstico dessas lesões.

A maioria dos autores (ALVES et al., 2004; GALLO et al., 1995; NORDKVIST et al., 2000; OHTAKÉ et al., 2002), têm demonstrado que a detecção da proteína P53 através da imunoistoquímica pode representar um forte indicativo de malignidade em lesões de glândula salivar, enquanto Karja et al. (1997) não encontraram associação entre o acúmulo da proteína P53 e o prognóstico em tumores benignos ou malignos de glândula salivar.

Neste estudo os resultados da imunoistoquímica não demonstraram expressão significativa ($p < 0.05$) da proteína P53 em nenhuma das lesões estudadas, corroborando com estudos anteriores (ALVES et al., 2002, 2004; MANTESSO et al., 2004; MCCLUGGAGE; PRIMROSE; TONER, 2006; NORDKVIST et al., 2000; ROSA et al., 1996). A mesma ausência de expressão foi observada em ambas linhagens celulares analisadas. A falta de detecção da proteína P53 nos sugere a possível presença da proteína selvagem, a qual apresenta meia vida curta e por este motivo, impossibilita a detecção imunoistoquímica. Porém, não pode-se excluir a possibilidade de inativação da mesma.

Em dois casos de adenoma pleomórficos avaliados, houve a presença de raras células marcadas, sendo estas localizadas nas regiões não lumbais e

próximas a metaplasias. É importante salientar que essas áreas metaplásicas já foram associadas a um maior potencial de transformação maligna (FREITAS et al., 2005).

Nenhuma das glândulas salivares normais avaliadas mostrou positividade para a P53, o que vai de encontro ao que foi relatado por Gallo et al. (1995).

Além da ausência de expressão da proteína P53, o presente estudo revelou forte expressão da Mdm2. Essa forte expressão foi encontrada tanto nas linhagens celulares, quanto nos casos avaliados pela técnica imunoistoquímica. Nesta última, a expressão de Mdm2 em adenomas pleomórficos e mioepiteliomas apresentou resultados estatisticamente significantes ($p=0.004$) e ($p=0.012$) respectivamente, quando comparadas às glândulas salivares normais.

Através da quantificação da proteína Mdm2 realizada pela técnica de western blotting foi possível observar que as linhagens AP4 e M1 apresentaram valores semelhantes a linhagem controle (SJSA1), na qual sabidamente exibe amplificação e superexpressão de Mdm2. Com relação a localização intracelular da proteína Mdm2, a análise por imunofluorescência demonstrou a expressão tanto citoplasmática quanto nuclear.

Combinando esses resultados (ausência de P53 com abundância de Mdm2), podemos supor que nas neoplasias avaliadas pode estar havendo degradação da P53 pela proteína Mdm2. Ainda nesse sentido, o fato da expressão de Mdm2 ter sido encontrada no citoplasma, onde a proteína é produzida e no núcleo, onde ela é ativa e capaz de levar a P53 para a degradação no citoplasma, também corrobora com esse resultado.

Sendo assim, a proteína P53 possivelmente encontra-se na forma selvagem, pois a mesma é capaz de estimular a produção de Mdm2, porém sua função deve estar prejudicada pelo excesso da proteína Mdm2.

Estes resultados se mostraram de acordo com achados prévios em relação a expressão de mdm2 em adenomas pleomorficos (MANTESSO et al., 2004; ARAÚJO et al., 2000a). Porém, em relação ao mioepitelioma, Mantesso et al (2004) observaram expressão nula do RNAm Mdm2 na linhagem M1 (mioepitelioma), enquanto este estudo demonstrou expressão acentuada da proteína Mdm2 nas três técnicas avaliadas. Estes dados podem indicar o aumento da tradução da proteína Mdm2, sem necessariamente haver a superexpressão do RNA mensageiro. Esse mecanismo já foi previamente descrito na literatura (MATSUMOTO et al., 2004; SCHOLTT et al., 2001).

Nas glândulas salivares normais não houve marcação imunoistoquímica para a proteína MDM2. Este dado indica que realmente esta proteína deve estar envolvida na tumorigênese de lesões de glândula salivar.

A literatura pertinente às neoplasias de mama mostra similaridades em relação à literatura referente às neoplasias de glândulas salivares. Estes dois tipos de lesões, têm constituição celular semelhantes, ambas sendo formadas por células ductais e mioepitelias. Nosso estudo apresentou resultados semelhantes ao trabalho de McCann et al. (1995), no qual estudando neoplasias de mama, observaram que os tumores positivos para o Mdm2 estavam significativamente relacionados aos tumores com níveis baixos de marcação para o P53.

A proteína P21 atua como o principal efetor da proteína P53 e dessa forma, a expressão da proteína P21 pode ser usada para monitorar o estado da proteína P53

(EL-DEIRY et al., 1993). Em nosso trabalho a proteína P21 não apresentou expressão significativa em nenhuma das lesões ou linhagens celulares estudadas.

Na técnica de imunofluorescência pôde-se verificar raras células exibindo marcação nuclear para essa proteína. Esses resultados são similares a estudos prévios realizados por Mantesso et al. (2000) e são coincidentes com os resultados observados na análise imunoistoquímica dos mesmo autores, onde embora raras células apresentaram-se marcadas tanto no adenoma pleomórfico quanto no mioepitelioma, não foram observados valores estatisticamente significantes quando as lesões foram comparadas aos controles .

Na análise quantitativa realizada pela técnica do western blotting não houve expressão de P21 em nenhuma das linhagens, apenas na linhagem controle (HN6). Estes resultados sugerem a inativação da P53, pois a mesma é necessária para a ativação da transcrição da P21.

A proteína P21 foi inicialmente utilizada nesse estudo com o objetivo de monitorar a função da proteína P53. Essa função de monitoramento mostrou-se ineficaz, visto que os outros resultados apontam para a presença da proteína P53 selvagem, que em teoria deveria estar induzindo a expressão da P21. É imperativo esclarecer que estudos pregressos, utilizando técnicas mais sensíveis, demonstraram a presença da proteína P21 em lesões onde as técnicas de imunoistoquímica convencionais não demonstraram (AFFOLTER et al., 2005) e portanto, talvez seja esse o caso em questão. A ligeira discrepância entre os resultados da imunofluorescência e imunohistoquímica que mostram algumas células marcadas, e os resultados do western blotting que não encontrou nem uma mínima quantidade de proteína P21, também apontam para uma possível restrição técnica.

A proteína Akt representa um importante papel no crescimento tumoral através do mecanismo de inativação da p53 que envolve também a Mdm2 (VESTEY et al., 2005). A literatura não trás estudos desta proteína em neoplasias de glândula salivar, mas em neoplasias de tireóide Vasko et al. (2004) demonstraram a expressão nuclear da proteína Akt em lesões benignas e malignas que foram associadas a maior invasão tumoral e metástases. Em tumores benignos de tireóide a presença de pakt estava relacionada a atipias celulares.

Como resultado de nosso estudo, obtivemos expressão da proteína pAkt tanto em adenomas pleomórficos quanto em mioepiteliomas, nas lesões e nas linhagens celulares estudadas. Na imunoistoquímica a expressão do pAkt foi estatisticamente significativa ($p < 0.05$) nas duas neoplasias estudadas quando comparadas com os controles, enquanto nas glândula salivares normais, não houve marcação detectável.

Na técnica de western blotting a expressão de pakt das linhagens AP4 e M1 foi estatisticamente semelhante a linhagem controle (HN6), a qual sabidamente superexpressa a proteína Akt.

Nas duas linhagens estudadas foi observada a marcação tanto nuclear quanto citoplasmática para a proteína pakt, sendo a marcação nuclear mais intensa, assim como ocorreu com a expressão da Mdm2. Segundo Vestey et al. (2005), a pAkt apresentou expressão (citoplasmática) em grande parte dos carcinomas invasivos de mama estudados, mas a expressão nuclear ou citoplasmática da proteína pAkt não apresentou associação com a expressão da proteína Mdm2, nestes carcinomas.

Muitos estudos na literatura têm estudado a ativação e localização citoplasmática do Akt (FENG et al., 2004; TESTA; BELLACOSA, 2001; VESTEY et al, 2005; ZHOU et al., 2001) nas diversas neoplasias, porém Vasko et al. (2004) e

Wang e Brattain (2006) demonstraram que a localização nuclear pode estar envolvida da estimulação de processos neoplásicos.

De modo geral, analisando o comportamento das neoplasias estudadas em relação aos resultados obtidos, nota-se que tanto no adenoma pleomórfico quanto no mioepitelioma as proteínas Mdm2 e Akt demonstraram forte expressão, e dessa forma, possivelmente desempenham importante papel na tumorigênese destas lesões. A expressão do Akt pode nos sugerir uma maior facilitação da ação do Mdm2 em degradar a proteína P53. Porém, ainda não há informações suficientes para o estabelecimento de possível relação entre a superexpressão do Mdm2 e do Akt em neoplasias de glândula salivar, sendo este trabalho pioneiro no estudo da proteína Akt nestas lesões.

A partir deste ponto, novas pesquisas devem ser realizadas, para o melhor entendimento do papel dessas proteínas em neoplasias de glândula salivar, principalmente em relação a interação entre elas, a fim de esclarecer o seu papel no comportamento biológico, possibilitando no futuro, mais ferramentas para o desenvolvimento de tratamentos efetivos para esses tipos de neoplasias.

7 CONCLUSÃO

7.1 Há superexpressão do Mdm2 nos adenomas pleomórficos e mioepiteliomas .

7.2 Há superexpressão do Akt nos adenomas pleomórficos e mioepiteliomas.

7.3 As neoplasias avaliadas não apresentaram expressão das proteínas P53 e P21

7.4 Este estudo demonstra a participação das proteínas Mdm2 e Akt no desenvolvimento e/ou progressão tumoral dos adenomas pleomórficos e mioepiteliomas.

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.

Agrawal A, Yang J, Murphy RF, Agrawal DK. Regulation of the p14ARF-Mdm2-p53 pathway: An overview in breast cancer. *Exper Mol Pathol* 2006:1-8.

Alves FA, Perez DEC, Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP. Pleomorphic adenoma of the submandibular gland: clinicopathological and immunohistochemical features of 60 cases in brazil. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:1400-3.

Alves FA, Peres FR, Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP. PCNA, Ki-67 and P53 expression in submandibular salivary gland tumours. *Int J 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.

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

Angèle S, Reis Filho JS, Fulford LG, Treilleux I, Lakhani SR, Hall J. Expression of ATM, p53, and the MRE11-Rad50-NBS1 complex in mioepithelial cells from benign and malignant proliferation of the breast. *J Clin Pathol* 2006;57:1179-84.

Araújo VC, Carvalho YR, Araújo NS. Actin versus vimentin in myoepithelial cells of salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;77:387-91.

Araújo VC, Loyola AM, Pinto JR, 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.

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

Araújo VC, Martins MT, Leite KRM, Gomez RS, Araújo NS. Immunohistochemical MDM2 expression in minor salivary gland tumours and its relationship to P53 gene status. *Oral Oncol* 2000a;36(1):67-9.

Araújo VC, Sousa SOCM, Carvalho YR, Araújo NS. Application of immunohistochemistry to the diagnosis salivary gland tumors. *Applied Immunohist Mol Morphol* 2000b;8(3):195-202.

Assoian RK, Schwartz MA. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11(1):48-53.

Augello C, Gregório V, Bazan V, Cammareri P, Agnese V, Cascio S, et al. TP53 and P16 INK4A, but not H-KI-RAS, are involved in tumorigenesis and progression of pleomorphic adenomas. *J Cell Physiol* 2006;207:654-9.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidranky D. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetic of Head and Neck Tumours. Lyon:IARC Press; 2005. cap.5, 209-81.

Borgatti P, Zauli G, Colamussi ML, Gibellini D, Previati M, Cantley LL, et al. Extracellular HIV-1 Tat protein activates phosphatidylinositol 3- and Akt/PKB kinases in CD4+ T lymphoblastoid Jurkat cells. *Eur J Immunol* 1997;27(11):2805-11.

Broll R, Stark A, Windhovel U, Best R, Strik MW, Schimmelpenning H, et al. Expression of P53 and mdm2 mRNA and protein in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 1999;35(7):1083-8.

Bosari S, Viale G. The clinical significance of p53 aberrations in human tumours. *Virchows Arch* 1995;427:229-41.

Caffo O, Doglioni C, Veronese S, Bonzanini M, Marchetti A, Buttitta F. Prognostic value of p21^{waf1} and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 1996;2:1591-9.

Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995;13(4):1009-22

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

Craanen ME, Blok P, Offerhaus GJA, Meijer GA, Dekker W, Kuipers EJ, et al. P21 WAF1/CIP1 expression and the P53/Mdm2 feedback loop in gastric carcinogenesis. J Pathol 1999;189:481-6.

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

Domagala W, Welcker M, Chosia M, Karbowniczek M, Harezga B, Bartkova J, et al. P21/WAF1/Cip1 expression in invasive ductal breast carcinoma: relationship to p53, proliferation rate, and survival at 5 years. Virchows Arch 2001;439:132-40.

Dong M, Ma G, Tu W, Guo K, Tian Y, Dong Y. Clinicopathological significance of P53 and Mdm2 protein expression in human pancreatic cancer. World J Gastroenterol 2005;11(4):2162-5.

Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, Karmolinski A, Dworakowski R. 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.

El-Deiry WS, Tokino JW, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993;75:817-25.

Ellis GL, Auclair PL. Tumours of the salivary glands. 3rd ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1996.

Fakharzadeh SS; Trusko SP, George DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. EMBO J 1991;10:1565-9.

Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM. Mdm2 is a finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. J Biol Chem 2000;275:8945-51.

Feng J, Tamaskovic R, Yang Z, Brazil DP, Merlo A, Hess D. Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. J Biol Chem 2004;279(34):35510-37.

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.

Friedrich RE, Li L, Knop J, Giese M, Schmelzle R. Pleomorphic adenoma of the salivary glands: analysis of 94 patients. *Anticancer Res* 2005;25(3A):1703-5.

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;75:2037-44.

Göhring U-J, Bersch A, Becker M, Neuhaus W, Schöndorf T. P21^{WAF} correlates with DNA replication but not with prognosis in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* 2001;54:866-70.

Hantschmann P, Sterzer S, Jeschke U, Friese K. P53 expression in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, squamous cell hyperplasia and lichen sclerosus. *Anticancer Res* 2005;25(3):1739-45.

Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2003;260:502-8.

Hirata Y, Kiuchi K. Mitogenic effect of glial cell line-derived neurotrophic factor is dependent on the activation of p70S6 kinase, but independent of the activation of ERK and up-regulation of Ret in SH-SY5Y cells. *Brain Res* 2003;983(1-2):1-12.

Hoque MO, Kawanata H, Nakashiro K, Omotehara F, Hino S, Uchida K. Dysfunction of the p53 tumor suppressor pathway in head and neck cancer. *Intern J Oncol*, 2002;21:119-26.

Honda R, Yasuda H. Association of a p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J*, 1999;18:22-7.

Ito FA, Ito K, Vargas PA, Almeidas OP, Lopes MA. Salivary glands tumours in a brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Maxillofac Surg* 2005;34:533-6.

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

Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with P53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 82:92–7.

Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, Seki M, Tanaka K, Maeda Y, et al. Genetic changes of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992;52(14):3965-71.

Landers JE, Haines DS, Strauss JF 3rd, George DL. Enhanced translation: a novel mechanism of mdm2 oncogene overexpression identified in human tumor cells. *Oncogene* 1994;9(9):2745-50.

Leach FS, Tokino T, Meltzer P. p53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1993;53:2231-4.

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.

Lewis JE, Olsen KD, Sebo TJ. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathologic analysis of 73 cases. *Human Pathol* 2001;32(6):596-604.

Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 2003;302:1972–5.

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 SOCM, Araújo NS. Minor salivary gland tumors. A retrospective study of 164 cases in a Brazilian population. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1995;31B(3):197-201.

Luo Y, Hurwitz J, Massague J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* 1995;375(6527):159-61.

Maki CG. Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2. *J Biol Chem* 1999;274:16531–5.

Mantesso A, Loducca SV, Jaeger RG, Pinto DS, Araújo VC. Analysis of epithelial-mioepithelial carcinoma based on the establishment of a novel cell line. *Oral Oncol* 2003;39:453-8.

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

Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Merlo G, Chella A, Angeletti CA, et al. Mdm2 gene amplification and overexpression in non-small cell lung carcinomas with accumulation of the p53 protein in the absence of p53 gene mutations. *Diagn Mol Pathol* 1995;4(2):93-7.

Martínez J-C, Palomino J-C, Cabello A, Sepúlveda JM, Câmara AG, Ricoy J-R. 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. *Histopathology* 2005;46:184-194.

Matizonkas-Antonio LF, Mesquita RA, Sousa SOCM, Nunes FD. TP53 mutation in salivary gland neoplasms. *Braz Dent J* 2005;16(2):162-166.

Matsumoto K, Suzuki SO, Fukui M, Iwaki T. Accumulation of MDM2 in pleomorphic xanthoastrocytomas. *Pathol Intern* 2004;54:387-91.

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

Maxwell EL, Hall FT, Freeman JL. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. *J Otolaryngol* 2004;33(3):181-4.

McCann AH, Kirley A, Carney DN, Corbal LYN, 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.

McCluggage WG, Primrose WJ, Toner PG. Myoepithelial carcinoma (malignant myoepithelioma) of the parotid gland arising in a pleomorphic adenoma. *J Clin Pathol* 2006;51:552-6.

Medina D, Kittrell FS. P53 function is required for hormone-mediated protection of mouse mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 2003;63(1):6140-3.

Momand J, Zambetti GP. Mdm2: "big brother" of p53. *J Cell Biochem* 1997;64(3):343-52.

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992;69:1237-45.

Nagao T, Suganol, Ishida Y, Hasegawa M, Matsuzaki O, Konno A, et al. Basal cell adenocarcinoma of the salivary glands: comparison with basal cell adenoma through assessment of cell proliferation, apoptosis, and expression of p53 and bcl-2. *Cancer* 1998a;82(3):439-47.

Nagao T, Sugano I, Ishida Y, Kajima Y, Matsuzaki O, et al. Salivary gland malignant myoepithelioma: a clinicopathologic and immunochemical study of ten cases. *Cancer* 1998b;83(7):1292-9.

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.

Ng IOL, Lam KY, Ng M, Regezi JA. Expression of P21/waf1 in oral squamous cell carcinoma- correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. *Oral Oncol* 1999;35:63-9.

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

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K. Mutation in the p53 gene occurs in diverse human tumour types. *Nature* 1989;342:705-8.

Nordkvist A, Roijer E, Bang G, Gustafsson H, Behrend TM. Expression and mutation patterns of p53 in benign and malignant salivary gland tumors. *Int J Oncol* 2000;16(3):477-83.

Ohtaké S, Cheng J, Suzuki M, Ohshiro K, Zhang W, Saku T. Precancerous foci in pleomorphic adenoma of salivary gland: recognition of focal carcinoma and atypical tumor cell by P53 immunohistochemistry. *J Oral Pathol Med* 2002;31:590-7.

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992;358(6381):80-3.

Piette J, Neel H, Marechal V. MDM2: Keeping p53 under control. *Oncogene* 1997;15:1001-10.

Piffkó J, Bánkfalvi A, Öfner D, Tötsch M, Berens A, Joos U, et al. Proliferative (MIB1, mdm2) versus anti-proliferative (P53) markers in head and neck cancer. An immunohistochemical study. *Pathol Oncol Res* 1996;2(2):37-42.

Pilotti S, Torre GD, Lavarina C, Palma SD, Sozzi G, Minoletti F, et al. Distinct mdm2/p53 expression patterns in liposarcoma subgroups: implications for different pathogenetic mechanisms. *J Pathol* 1997;181:14-24.

Regezi JA, Dekker NP, Mcmillan A, Ramirez-Amador V, Meneses-Garcia A, Rivera LMRG, et al. p53, p21, Rb and Mdm2 proteins in tongue carcinoma from patient <35 versus> 75 years. *Oral Oncol* 1999;35:379-83.

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. *Diag Mol Pathol* 1996;5(1):65-73.

Röijer E, Nordkvist A, Ström A, 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.

Rosa JC, Fonseca I, Félix A, Soares J. P53 immunoexpression in carcinoma arising in pleomorphic adenoma. *Int J Surg Pathol* 1996;3:257-62.

Rosa JC, Fonseca I, Félix A, Soares J. Immunoexpression of c-erbB-2 and P53 in benign and malignant salivary neoplasms with myoepithelial differentiation. *J Clin Pathol* 1997;50:661-3.

Rotter V, Wolf D, Pravtcheva D, Ruddle FH. Chromosomal assignment of the murine gene encoding the transformation-related protein p53. *Mol Cell Biol* 1984;4(2):383-5.

Sabbatini P, McCormick F. Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274(34):24263-9

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

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997;91:325–34.

Skomedal H, Kristensen GB, Nesland JM, Borresen-Dale A, Tropé C, Holm R. TP53 alterations in relation to cell cycle- associated proteins p21, cyclin D1, CDK4, Rb, Mdm2 and EGFR in cancers of the uterine corpus. *J Pathol* 1999;187:556-62.

Slack A, Chen Z, Tonelli R, Pule M, Hunt L, Pession A, et al. The p53 regulatory gene mdm2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *PNAS* 2005;102(3):731-6.

Soini Y, Pääkkö P, Alavaikko M, Vähäkangas K. p53 Expression in lymphatic malignancies. *J Clin Pathol* 1992;45:1011-4.

Tachibana M, Kawamata H, Fujimori T, Omotehara F, Horiuchi H. Dysfunction of p53 pathway in human colorectal cancer: analysis of p53 gene mutation and the expression of the p53-associated factors p14ARF, p33ING1, p21 WAF1 and Mdm2. *Intern J Oncol* 2004;25:913-20.

Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(20):10983-5.

Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, et al. Akt activation and localization correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet* 2004;41:161-70.

Veloso M, Wirtz F, Kaserer K, Heinze G, Magalhães A, Herbst F, et al. p53 Gene status and expression of p53, mdm2, and p21Waf1/Cip1 protein in colorectal cancer. *Virchow Arch* 2000;437:241-7.

Vestey SB, Sen C, Calder CJ, Perks CM, Pignatelli M, Winters ZE. Activated Akt expression in breast cancer: correlation with p53, Mdm2 and patient outcome. *Eur J Cancer* 2005;41:1017-25.

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 Sign* 2006;18(10):1722-31.

Wang Y, Lin R, Tan Y, Chen J, Wang Y. 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):154-63.

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 Pathol* 2002;198:326-34.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. Cytoplasmic localization of p21^{Cip/waf1} by Akt-induced phosphorylation in Her-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 2001;3:973-82.

Zhuo Z, Hui W, Mao L, Sudhir A, Xinbin C, Ruiwen Z. MDM2 is a negative regulator of P21^{waf1/cip1}, independent of P53. *J Biol Chem* 2004;279(16):16000-6.

ANEXO A – Parecer de Aprovação do comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 137/05

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Quantificação das proteínas P53, Mdm2, P21, P14, PRb e PAkt em neoplasias de glândula salivar através da técnica de Western Blotting*", de responsabilidade da Pesquisadora **Yonara Maria Freire Soares Marques**, sob orientação da Professora Doutora **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