YONARA MARIA FREIRE SOARES MARQUES

Análise da Via do Akt em Neoplasias Benignas e Malignas de Glândulas Salivares

São Paulo

2010

YONARA MARIA FREIRE SOARES MARQUES

Análise da Via do Akt em Neoplasias Benignas e Malignas de Glândulas Salivares

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa. Dra. Suzana C. Orsini Machado de Sousa

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Marques, Yonara Maria Freire Soares
Análise da via do Akt em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares / Yonara Maria Freire Soares Marques; orientador Suzana C. Orsini Machado de Sousa. -- São Paulo, 2010.
84p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

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

1. Neoplasias das glândulas salivares. 2. Proteínas proto-oncogênicas. 3. Patologia bucal. I. Sousa, Suzana C. Orsini Machado de. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marques YMFS. Análise da via do Akt em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____
Julgamento: _____Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A meus pais

Que tanto amor dedicaram a mim todos esses dias. Vocês são meus exemplos de moral e determinação.

A minhas duas irmãs

Que estiveram ao meu lado, participando intensamente da minha vida, mesmo com a distância que nos separa. Transformo o orgulho que vocês têm por minhas conquistas, em força para superar meus maiores desafios.

Ao meu marido Artur

Que sempre, com amor, me compreendeu e incentivou, mesmo nos momentos que estive ausente e que fez dos meus sonhos, os dele também.

A minha tia Maria de Lourdes

Que junto a meus pais, com amor de mãe, me dedicou atenção e carinho desde os meus primeiros anos vida até hoje. Sempre me incentivou na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Meus sinceros agradecimentos aos profissionais com os quais tive a honra de trabalhar: minha orientadora, **Suzana C O M de Souza**, por ter me dado oportunidade de fazer o doutorado junto a esta renomada universidade, pelo estímulo e apoio que sempre prestou a mim, por acreditar e confiar em minhas escolhas ,e pelos constante ensinamento de patologia; meus co-orientadores, **Paul Speight** e **Keith Hunter**, pelo imenso carinho com que me receberam em Sheffield, por confiarem mim e por todo conhecimento compartilhado da área de pesquisa e patologia. Além disso, gostaria de expressar minha imensa gratidão a **Andrea Mantesso**, por ter me iniciado na pesquisa das neoplasias de glândula salivares e por ser uma grande amiga nesses anos de pós-graduação; e a **Décio dos Santos Pinto Júnior** por ter me ensinado muito que sei hoje sobre vias de sinalização e patologia.

AGRADECIMENTOS

Aos professores **Fábio, Marília, Marina e Karen**, que sempre se esforçaram para oferecer o melhor ensino tanto para graduação, quanto para pós-graduação e por quem eu tenho profunda admiração. Todos vocês são exemplo que tentarei seguir ao longo de minha almejada vida acadêmica.

A professora **Vera Araújo**, a qual sempre esteve disposta a me ajudar em todos os momento que precisei.

A Dra **Vanessa Freitas**, que contribuiu com nossos trabalhos e nos incentivou a aprender novas técnicas, além de compartilhar experiências laboratoriais importantes para minha formação como pesquisadora.

A professora **Maria do Carmo de Abreu e Lima**, pelo apoio e confiança em nosso trabalho.

A **Elisa, Adriana, Juvani, Bia, Zilda, Nair e Néia**, que sempre me ajudaram de forma incansável e que fizeram dos dias na patologia momentos prazerosos.

Esta tese não poderia ter sido escrita sem o generoso auxílio de todas estas pessoas que compartilharam comigo seus conhecimentos em suas respectivas áreas. A todos vocês, manifesto meu profundo apreço.

Aos amigos novos e antigos da pós-graduação **Renara Acay, Alexandra, Brunno, Érika Pereira,Camila Chicaro, Camila Rodini, Fabiana Martins, Karin, Ana Cláudia, Lucyene, Felipe Daltoé, Felipe Sperandio, Joelma, Juliana, Fátima, Sérgio Cury, Hélder, Flávia Pontes, Felipe Torquato, Katiuchia, Ronald, Valtuir, Maria Fernanda, Gabriela , Renata Caramez, Michella** e **Rita.** De forma ainda mais especial e carinhosa, gostaria de agradecer a **Marina de Deus**, por seu uma amiga, quase irmã pra mim, por todo o período que passamos juntas; a

Flávia Calo; Sérgio Alves; Fernanda Yamamoto; Roberto Rejas; Fábio Coracin; Aluana e **Fernanda Giudice**, por tornarem meu dia-a-dia mais fácil e feliz.

A todos, muito obrigada pelos bons momentos que passamos juntos no departamento. Sempre me lembrarei de vocês com carinho.

Gostaria também de agradecer a **Michelle Agostini**, por toda atenção e apoio na realização da técnica da co-imunoprecipitação e especialmente, a **Alan Roger**, pelo convívio em Sheffield, minha experiência no doutorado sanduíche não seria tão boa sem a sua amizade.

Aos amigos e funcionários da Universidade de Sheffield que demonstraram grande amizade e carinho no período do meu estágio PDEE.

A **CAPES** e **FAPESP** pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado e verba para custeio desta pesquisa, respectivamente.

Na Grécia Antiga (Casa de Banhos):

Discípulo de Arquimedes:

" – Mestre, sois tão sábio; como poderei um dia saber tanto quanto vós?"

Arquimedes:

" Através da força de vontade..."

Discípulo de Arquimedes:

" – Como assim, Mestre?"

Arquimedes afogou a cabeça do seu discípulo dentro d'água e o deixou sufocado por cerca de 40 segundos, depois a soltou...

Discípulo de Arquimedes:

" – Mestre, o que fizestes???

Arquimedes:

" – O dia em que quiserdes ter sabedoria com a mesma vontade com que quisestes respirar, então sereis um grande sábio..."

RESUMO

Marques YMFS. Análise da via do Akt em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares[tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

A proteína Akt modula a função de numerosos substratos envolvidos na regulação da sobrevivência celular, progressão do ciclo celular e crescimento celular. Estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram a superexpressão de Akt em adenoma pleomórfico, mioepitelioma e carcinoma adenóide cístico. O objetivo deste estudo foi analisar a via da proteína Akt através da avaliação da expressão das proteínas NFkB e PTEN em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares através das técnicas de imunohistoquímica, western blotting e imunofluorescência, e a possível interação protéica direta entre p-Akt/Mdm2 e p-Akt/PTEN em linhagem de carcinoma adenóide cístico. A superexpressão nuclear na proteína PTEN foi encontrada nas duas neoplasias malignas estudadas. Além disso, não foi observada interação direta entre as proteínas p-Akt/Mdm2 e p-Akt/PTEN, as quais apresentam localização nuclear em neoplasias de glândulas salivares.

Palavras-chave: Mdm2. Akt. NFkB. PTEN. Neoplasias de glândulas salivares.

ABSTRACT

Marques YMFS. Analisys of Akt pathway in benign and malignant salivary galnd tumours [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

The Akt protein modulates the function of numerous substrates involved in the regulation of cell survival, cell cycle progression and cell growth. Previous studies from our laboratories showed overexpression of Akt and Mdm2 followed by the lack of p53 expression in pleomorphic adenoma, myoepithelioma and adenoid cystic carcinoma. The aim of this study was to analyze the Akt pathway through evaluation of expression of NFkB and PTEN proteins in pleomorphic adenoma, carcinoma ex pleomophic adenoma and adenoid cystic carcinoma by western blotting, immunofluorescence and immunohistochemical techniques, and we have intended to analyse a possible direct interaction between p-Akt/Mdm2 and p-Akt/ PTEN protein in salivary gland tumours. Overexpression of nuclear PTEN was present in both carcinomas studied. In addition, there was no direct interaction between p-Akt/Mdm2 and p-Akt/ PTEN protein, which presents a nuclear localization in salivary gland tumours.

Keywords: Mdm2. Akt. NFkB. PTEN. Salivary gland tumours.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Estrutura da variante 1 da proteína Akt. Importantes resíduos contidos dentro dos domínios catalítico (Thr308) e regulatório (Sr473).....23

Figura 2.2 - Mecanismo de ativação e principais alvos envolvidos na via de sinalização da proteína Akt responsáveis pela inibição da apoptose e proliferação celular.....24

Figura 2.3 - Principais mecanismo de ativação da proteína NFkB.....29

Figura 4.1 - Desenho esquemático da técnica de co-imunoprecipitação.....52

Figura 4.2 - Distribuição esquemática dos cilindros em um bloco receptor do TMA. Os círculos vermelhos representam os controles positivos; os verdes, os controles negativos; e os azuis, os tumores ou grupos controle do estudo 54

Figura 4.3 - Imagem esquemática do processo de preparação dos blocos receptores e das lâminas para o TMA (http://www.microarraystation.com/tissue-microarray/).....55

Figura 5.1 - Expressão das proteínas NFkB e PTEN, comparadas a expressão da proteína β-actina nas linhagens de CAC2, AP4 e linhagem controle (Hacat).....59

Figura 5.2 - Imunoexpressão das proteínas NFkB (A e C) e PTEN (B e D) nas linhagens AP4 e CAC2. A- Forte expressão citoplasmática de NFkB e discreta nuclear (setas) na linhagem CAC2, sendo esta última expressa em poucas células; C- Expressão apenas citoplasmática de NFkB na linhagem AP4; B- Forte expressão nuclear e discreta citoplasmática de PTEN em CAC2; D- Forte expressão apenas citoplasmática de PTEN na linhagem AP4 61

Figura 5.3 - Expressão das proteínas PTEN e Mdm2 no lisado precipitado para p-Akt e no lisado livre p-Akt (sobrenadante).....63

Figura 5.4 - Exemplo de Tissue microarray com 38 cilindros. Estão incluídos neste corte controle positivo, glândula salivar normal e 19 diferentes casos de

CXPA. GSN (glândula salivar normal); Controle +(carcinoma epidemóide), Tumores (amostras). 63

Figura 5.5 - Expressão citoplasmática da proteína NFkB em glândula salivar normal (A), em adenoma pleomórfico(B), em carcinoma adenóide cístico (C) e em carcinoma ex-adenoma..... 66

Figura 5.6 - Expressão imunoistoquímica da proteína PTEN em glândula salivar normal (A), em adenoma pleomórfico (B), em carcinoma adenóide cístico (C) e em carcinoma ex adenoma pelomórfico. 67

Figura 5.7 - Expressão imuno -histoquímica da proteína NFkB e PTEN nos diferentes padrões histológicos dos carcinomas adenóides císticos. (A e B) padrão sólido, (C e D) padrão tubular e (E e F) padrão cribriforme... 68

Gráfico 5.1 -Média dos valores obtidos da quantificação das bandas de western blotting. Expressão das proteínas NFkB e PTEN nas linhagens CAC2 e AP4, comparadas a expressão na linhagem controle. 59

Gráfico 5.2 -Médias das expressões nucleares e citoplasmáticas da proteína NFkB..... 66

Gráfico 5.3 -Médias das expressões nucleares e citoplasmáticas da proteína PTEN..... 67

Gráfico 5.4 -Médias das expressões nucleares(n) e citoplasmáticas (c) da proteína NFkB e PTEN nos diferentes padrões histológicos dos carcinomas adenóides císticos estudados..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Relação das linhagens de neoplasias de glândulas salivares.....40

Tabela 4.2- Relação dos adenomas pleomórficos incluídos no estudo.....42

Tabela 4.3- Relação dos carcinomas adenóides císticos incluídos no estudo.....43

Tabela 4.4- Relação dos carcinomas ex adenomas pleomórficos incluídos no estudo.....44

Tabela 4.5- Volume de reagentes utilizados no gel 10% acrilamida com SDS 47

Tabela 4.6- Relação de anticorpos utilizados no western-blotting.....48

Tabela 4.7- Relação de anticorpos primários utilizados na imunofluoresência 49

Tabela 4.8- Imuno-histoquímica: anticorpos, concentração e tempo de incubação.....52

Tabela 4.9- Imuno-histoquímica:anticorpos, concentração e tempo de incubação.....56

Tabela 5.1- Análise estatística dos resultados obtidos pelas leituras das bandas (triplicata) nas linhagens em estudo, comparadas com a linhagem controle 59

Tabela 5.2- Localização da expressão dos anticorpos NFkB e PTEN nas reações de imuofluorescência.....61

Tabela 5.3- Resultados do teste estatístico para a expressão da proteína NFkB. ..69

Tabela 5.4- Resultados do teste estatístico para a expressão da proteína PTEN. .69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína Akt
DNA	Do inglês “Desoxyribonucleic acid”ou ácido desoxiribonuclé
DMEM	Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbeco
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra
Mdm2	Proteína Mdm2
NFkB	Proteína NFkB
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
PBS	Soro fetal bovino
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PTEN	Proteína PTEN
p-Akt	Proteína Akt fosforilada

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
C	graus Celsius
βbeta	Segunda letra do alfabeto grego
µm	Micrômetro
X	Vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DA LITERATURA 16
3 PROPOSIÇÃO 39
4 MATERIAL E MÉTODOS 40
4.1 Casuística 40
4.2 Cultivo Celular 45
4.3 Western-Blotting 46
4.4 Imunofluorescência 49
4.5 Co-imunoprecipitação 51
4.6 Tissue Micro Array 54
4.7 Imuno-histoquímica 56
5 RESULTADOS 58
6 DISCUSSÃO 70
7 CONCLUSÕES 75
REFERÊNCIAS 76
ANEXOS 83

1 INTRODUÇÃO

Os tumores de glândulas salivares correspondem a aproximadamente 2 a 6,5% de todos os neoplasmas de cabeça e pescoço. A ampla variedade de comportamentos biológicos, tipos histológicos e a falta de conhecimento a respeito da tumorigênese dessas lesões, tornam difícil seu diagnóstico e tratamento, suscitando uma constante busca por informações que desvendem os aspectos moleculares envolvidos no desenvolvimento desses tumores.

Diversos estudos têm demonstrado 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 tumorigênese e na progressão das mais diversas neoplasias. Proteínas relacionadas à inativação da p53, tais como a Mdm2, também representam um papel fundamental na tumorigênese de inúmeras neoplasias humanas.

Trabalhos anteriores em nosso departamento demonstraram a superexpressão do RNAm do Mdm2, corroborada pela superexpressão das proteínas Mdm2 e concomitante superexpressão da proteína p-Akt em neoplasias de glândulas salivares. A proteína Akt representa um importante facilitador da ação do Mdm2 sobre a proteína p53, logo se torna fundamental a elucidação da via de ativação desta proteína.

Desta forma, nos propusemos a analisar a via do Akt, responsável pela hiperativação da proteína Mdm2, através do estudo das proteínas NFkB e PTEN com a utilização das técnicas de imuno-histoquímica, western blotting e imunofluorescência em neoplasias de glândulas salivares, além disso analisamos a possível interação direta entre as proteínas Mdm2/Akt e PTEN/Akt em carcinoma adenóide cístico através a técnica de co-imunoprecipitação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Visando a uma melhor compreensão, a revisão da literatura será dividida em tópicos.

2.1 Tumores de Glândulas Salivares

Os tumores de glândulas salivares compreendem de 2 a 6,5% dos neoplasmas de cabeça e pescoço. O pico de incidência dos tumores de glândula ocorre na sexta e sétima décadas de vida. As médias de idade dos pacientes acometidos com tumores benignos e malignos são de 46 e 47 anos, respectivamente (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

Estudos envolvendo uma ampla amostragem demonstraram que 64 a 80% de todos os tumores epiteliais de glândulas salivares acometem a glândula parótida, 7 a 11% a glândula submandibular, menos de 1% ocorre em glândulas sublinguais e 9 a 23% podem surgir em glândulas salivares menores. Dentre todos estes, 54 a 79% são tumores benignos e 21 a 46% malignos (Ellis; Auclair, 2008).

O adenoma pleomórfico é a neoplasia de glândula mais comum e corresponde a aproximadamente 50 a 74% de todas as neoplasias de glândulas salivares. O segundo tumor benigno de glândula mais comum é o tumor de Warthin, representando 4 a 14% de todos os tumores. O carcinoma mucoepidermóide é citado como sendo o tumor maligno mais comum, porém em alguns estudos, o carcinoma adenóide cístico e carcinoma ex-adenoma pleomórfico são descritos como os mais comuns. Estudos em populações brasileiras demonstraram que o carcinoma adenóide cístico pode representar o segundo ou quarto tumor mais freqüente de glândula salivar (Barnes et al., 2005; Ito et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008; Oliveira et al., 2009).

Nesta revisão de literatura serão apresentados o adenoma pleomórfico, o carcinoma ex adenoma pleomórfico e o carcinoma adenóide cístico.

2.1.1 Adenoma Pleomórfico

O adenoma pleomórfico, usualmente, se apresenta como uma neoplasia de aproximadamente 2 a 5 cm, de crescimento lento e indolor. Acomete com mais freqüência as glândulas parótidas, seguidas por glândulas menores no palato, glândula submandibular e outras glândulas menores intrabucais; em pacientes com média de idade entre 40 e 50 anos e leve predileção pelo sexo feminino (Yih et al.,2005; Ito et al., 2005; Oliveira et al., 2009).

O adenoma pleomórfico é um tumor benigno de origem epitelial, o qual apresenta diferenciações epiteliais (ductais ou mioepiteliais) em permeio, geralmente, a um tecido de aparência mixóide, mucóide ou condróide. A diferenciação epitelial manifesta-se como uma mistura de estruturas ductais bem formadas associadas a células não-ductais (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008). O componente epitelial é formado por células 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 compostas por uma grande variedade de tipos celulares, incluindo células cuboidais, basalóides, pavimentosas, fusiformes, plasmocitóides, e claras. Raramente são vistas células mucosas, sebáceas e acinares serosas (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

As estruturas semelhantes a ductos são formadas por células luminais cubóides com uma camada de células mioepiteliais ao redor dessas. Este componente mioepitelial pode ser formado por células morfologicamente similares a camada luminal ou apresentar o citoplasma claro e núcleo hipercromático. Os ductos freqüentemente exibem material eosinofílico em seu interior e metaplasia escamosa. As células mioepiteliais podem formar, ainda, um padrão reticular ou apresentar-se na forma de lençol de células fusiformes, plasmocitóides ou hialinas. 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; Ellis; Auclair, 2008).

A diversidade morfológica desta lesão ocorre devido à produção de quantidades variáveis de matriz (mucopolissacarídeo) pelas células ductais ou mioepiteliais, a qual leva a formação de metaplasias condróide e óssea (Dardick et

al., 1983). Em glândula salivar maior, geralmente, o tumor apresenta-se encapsulado, porém quando acomete as glândulas menores, a ausência de cápsula é freqüente (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

O tratamento de escolha para os adenomas pleomórficos de glândulas submandibulares é a remoção completa da glândula, para as glândulas menores é a excisão cirúrgica com a remoção de uma pequena porção de tecido normal circundante. Nestas duas localizações as recidivas são raras. No entanto, quando esta lesão acomete as glândulas parótidas, no passado, era recomendada a enucleação cirúrgica, porém esta abordagem apresentava altos índices de recidivas, superior a 40% dos casos. Estudos recentes têm demonstrado a redução desta taxa para índices inferiores a 1% com a implementação da parotidectomia parcial ou a superficial total com preservação do nervo facial. A técnica conservadora de dissecação extracapsular também tem sido associada a baixas taxas de morbidade (dano ao nervo facial e síndrome de Frey) e recorrência de 2% dos casos. A radioterapia pós-operatória tem se mostrado benéfica nos casos de recorrências multifocais (Renehan et al., 1996; Hancock, 1999; Valentini et al., 2001; Speight; Barrett, 2002; Mendenhall et al., 2008).

2.1.2 Carcinoma Ex-adenoma Pleomórfico

O Carcinoma ex-adenoma pleomórfico é um tumor que surge em locais onde há evidências histológicas de um adenoma pleomórfico prévio, logo o diagnóstico requer identificação do tumor benigno prévio ou da presença de áreas de adenoma pleomórfico dentro do carcinoma. Esta lesão representa 9,5% dos adenomas pleomórficos e 6% dos tumores malignos de glândulas salivares. O carcinoma ex-adenoma pleomórfico surge em pacientes com idade um pouco mais avançada, apresenta geralmente tamanho maior e possui maior tempo de duração, quando comparado a sua contraparte benigna (Speight; Barrett, 2002; Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

O Carcinoma ex-adenoma pleomórfico acomete as glândulas parótida, submandibular, sublingual e menores, em ordem decrescente de freqüência (Lewis et al., 2001). A longevidade e a recorrência parecem estar ligadas ao aumento do

risco de transformação maligna dos adenomas pleomórficos. Eneroth e Zetterberg (1974) demonstraram que a incidência de transformação maligna em adenomas pleomórficos aumenta com a duração do tumor. Eles observaram a incidência de malignização de 1,6% ou menos, em adenomas pleomórficos com 5 anos de duração e 9,6% em tumores presentes a mais de 15 anos.

Histologicamente, o tumor apresenta uma proporção variável de porção benigna versus maligna. Ao contrário dos carcinomas, apenas as células epiteliais são malignas. A maioria dos tumores é infiltrativo, porém, raramente o carcinoma é confinado em cápsula, sendo categorizados como *in situ* ou não invasivo, e outras vezes pode mostrar-se minimamente invasivo (≤ 1,5 mm de penetração do componente maligno na cápsula). Devido a grande dificuldade na identificação de um carcinoma ex adenoma pleomórfico confinado em uma cápsula, estudos sugerem a análise da evolução da expressão das proteínas p53 e c-erB-2, neste tumores, pois estas proteínas podem estar envolvidas nos estágios iniciais de malignização (Freitas et al, 2006). O carcinoma ex adenoma pleomórfico apresenta uma grande variedade de tipos histológicos, podendo os elementos carcinomatosos compreenderem um padrão de adenocarcinoma NOS, carcinoma do ducto salivar, carcinoma mucoepidermóide, carcinoma adenóide cístico, ou outros. Padrões de crescimento destrutivo e infiltrativo representam os critérios de diagnóstico mais confiáveis. Embora o tumor possa apresentar células com núcleos hipercromáticos e pleomorfismo, ocasionalmente podem apresentar mínima atipia. Podem se observar com freqüência necrose e figuras de mitose, sendo mais comum em tumores de alto grau. (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

O tratamento para o carcinoma ex-adenoma pleomórfico deve ser individualizado com base na localização do tumor, envolvimento de estruturas adjacentes, subtipos histológicos e grau de malignidade. Para a maioria dos tumores de parótida, a parotidectomia total deve ser realizada para remoção de todo o tumor e de nódulos intraparotídeos. O nervo facial deve ser ressecado apenas se estiver diretamente envolvido pelo tumor. Devido à alta taxa de metástase regional, de até 50% em alguns estudos, é recomendado o esvaziamento cervical nos casos de tumores de alto grau. Para estas neoplasias de alto grau também é recomendada a radioterapia pós-operatória com a finalidade de reduzir a recorrência local. Uma ou mais recorrências desta lesão pode acometer 23 a 53% dos pacientes (Olsen; Lewis, 2001; Ellis; Auclair, 2008).

Diversos fatores histológicos são importantes para o estabelecimento do prognóstico do paciente, como o tamanho do tumor, grau de malignidade, proporção da porção benigna versus maligna e a extensão da invasão (Lewis et al., 2001; Olsen; Lewis, 2001).

2.1.3 Carcinoma Adenóide Cístico

O carcinoma adenóide cístico é um tumor, geralmente de crescimento lento e sintomático devido à tendência de invasão perineural. Este tumor acomete pacientes de todas as idades, porém apresenta-se mais freqüente em adultos na quinta e sexta décadas de vida e não apresenta predileção por sexo, exceto em tumores submandibulares, nos quais o sexo feminino é mais acometido. O carcinoma adenóide cístico compreende aproximadamente 10% de todas as neoplasias epiteliais de glândulas salivares, 30% das neoplasias epiteliais e 35% das neoplasias malignas de glândulas salivares menores (Loyola et al,1995; Barnes et al., 2005).

Histologicamente apresenta aspecto basalóide caracterizado pela proliferação de células epiteliais e mioepitelias diferenciadas dispostas em configurações morfológicas variadas, sendo estes padrões morfológicos classificados como tubular, cribriforme e sólido.

O padrão cribriforme é o mais freqüente e o sólido o mais raro, no entanto a mistura de padrões, em uma única lesão, representa uma característica comum desta lesão. O tipo de padrão predominante na lesão tem influência no comportamento e prognóstico da neoplasia (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

O padrão cribriforme é caracterizado pela aparência de queijo suíço, com células neoplásicas formando ilhas contendo estruturas pseudocísticas pequenas e circulares de diferentes tamanhos. Os pseudocistos, geralmente, contêm material amorfo, basofílico ou eosinofílico nos seus interiores. As células tumorais são pequenas e cubóides, exibindo núcleos profundamente basofílicos, formatos variados e citoplasma escasso (Barnes et al., 2005; Ellis ; Auclair, 2008).

O padrão tubular também é composto pelo dois tipos celulares (ductais e mioepiteliais), porém as células com diferenciação tubular são mais facilmente

discerníveis. Muitos tumores com este padrão apresentam um lúmen formado por estas células ductais, as quais são circundadas por células com diferenciação mioepitelial. As células mioepiteliais geralmente apresentam-se com núcleo angulado e citoplasma claro. As células neoplásicas são arranjadas em ilhas, as quais são separadas umas das outras por um estroma que pode mostrar-se fibroso, hialinizado e, por vezes, confere à lesão um padrão, que alguns chamam de "trabecular" (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

O padrão sólido é caracterizado pela proliferação de células na forma de lençóis, com pouca ou nenhuma evidência de espaço semelhantes a cistos. Individualmente as células são semelhantes ao padrão cribrifrome e tubular, porém apresentam núcleos maiores e menos angulados. O tipo celular predominante é o mioepitelial basalóide, mas focos de células com diferenciação ductal também podem ser vistas. As figuras de mitose, que não são comuns nos outros dois padrões, neste torna-se evidente. Pleomorfismo celular e necrose, também são mais evidentes neste padrão (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

A tendência à invasão perineural nesta neoplasia é bastante conhecida, mas não representa um fator patognomônico desta lesão, podendo ser comumente observada no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade dentre outros. A invasão neural, geralmente acomete a bainha do nervo, porém a invasão propriamente do nervo também é observada em algumas lesões. Diferente dos outros tumores de glândulas salivares, o carcinoma adenóide cístico tem a propriedade de se infiltrar no nervo além das margens do tumor. Esta característica explica, em parte, as altas taxas de recorrências desta lesão e a sintomatologia dolorosa, por vezes relatada pelos pacientes (Barnes et al., 2005; Ellis; Auclair, 2008).

O tratamento mais apropriado para este tumor em cabeça e pescoço ainda não foi completamente estabelecido. A escolha da modalidade terapêutica é influenciada pela localização, grau histológico, estágio e comportamento biológico. Apesar da incerteza quanto à forma ideal de tratamento, muitos estudos têm mostrado a eficácia da cirurgia e radioterapia para os carcinomas adenóides císticos de cabeça e pescoço (Bradley, 2004). Quando o tumor acomete a glândula parótida o tratamento mais adequado é a excisão cirúrgica com margens de segurança com preservação do nervo facial, caso este último não esteja intimamente envolvido pelo tumor, seguida de radioterapia pós-operatória. Em glândula submandibular é

recomendada remoção total da glândula, esvaziamento cervical (região supraomoióde a), seguida de radioterapia pós-operatória. Já em glândulas menores é sugerida a excisão radical total seguida de radioterapia. (Bradley, 2004; Triantafillidou et al., 2006).

O índice de recorrência local do carcinoma adenóide cístico é aproximadamente 15 a 85% em estudos incluindo grandes séries de casos. Os achados patológicos associados a maior índice de recorrência são: margens ressecadas positivas, localização, grau de malignidade da lesão, invasão perineural e a presença de componentes neoplásicos com padrão sólido. Porém, neoplasias com grau I de malignidade têm sido associadas a recorrência precoce e risco prematuro de desenvolvimento de metástase. A incidência de metástase a distância varia de 35% a 50% em média, com em acompanhamentos de 15 a 20 anos. A metástase acomete com mais freqüência os pulmões, porém alguns autores sugerem que este dado pode estar sendo subestimado em relação aos órgãos afetados pela lesão, pois uma vez detectada a metástase pulmonar, nenhuma investigação adicional é realizada. Os pacientes devem ser acompanhados por longo período de tempo, pois a recorrência e metástases podem ocorrer num longo período após tratamento (Spiro, 1997; Bradley, 2004; Kokemueller et al., 2004; Barnes et al., 2005; Tincani et al., 2006).

A sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 35%, porém em longo prazo esta taxa cai para o equivalente a 20% dos casos. Oitenta a 90% dos pacientes morrem em decorrência da lesão em 10 a 15 anos (Barnes et al., 2005; Ellis; Aulclair, 2008).

A carcinogênese e os fatores que levam ao desenvolvimento dos tumores de glândulas salivares permanecem obscuros, suscitando uma constante busca por mais informações que levem ao esclarecimento desta dinâmica, para o estabelecimento de futuras ações preventivas e terapêuticas mais eficazes e direcionadas aos fatores causais.

Diversos estudos têm investigado a participação de diferentes alterações associadas a estas lesões. Sendo estas, mutações, inativação de vias homeostáticas, dentre outras.

2.2 Função e interação entre as proteínas Akt, MDM2, NFkB e PTEN

A proteína kinase B ou Akt é uma kinase serina/treonina, produto do oncogene *v-akt*. Nos mamíferos, esta proteína apresenta três isoformas conhecidas, são elas: PKBα (Akt1), PKBβ (Akt2) e PKBγ (Akt3). O PKB (Akt) é ativado em células expostas a diversos estímulos como hormônios, fatores de crescimento, e componentes da matriz extracelular (Nicholson; Anderson, 2002). Acredita-se que os subtipos de Akt compartilhem substratos similares, embora os níveis de expressão sofram variação entre os tecidos. A Akt1 é o tipo predominante na maioria dos tecidos. As proteínas Akt1 e Akt2 são expressas no cérebro, timo, fígado, coração, rins e pulmão, enquanto a Akt3 é freqüentemente observada em altos níveis no cérebro e testículos e baixos níveis no coração, fígado, pulmão e músculo esquelético (Coffer et al., 1998).

A diferentes isoformas da proteína Akt (Akt1/2/3) compartilham mais de 80% da identidade sequencial dos aminoácidos. As proteínas possuem um domínio PH (do inglês pleckstrin homology) com cerca de 100 aminoácidos na região N-terminal, responsável pela ancoragem na membrana, seguido por um domínio catalítico, e uma região regulatória C-terminal (Figura 2.1) (Nicholson; Anderson, 2002).

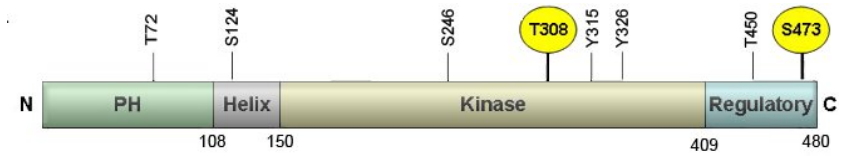

Figura 2.1 - Estrutura da variante 1 da proteína Akt. Importantes resíduos contidos dentro dos domínios catalítico (Thr308) e regulatório (Sr473)

A proteína Akt faz parte da via de sinalização da PI3K, sendo esta ativada por uma grande variedade de fatores de crescimento incluindo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), interleucina 3 e 6 (IL-3/6), e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Sob ativação, o receptor de fator de crescimento ativa a subunidade catalítica do PI3K (p110) via recrutamento da subunidade reguladora correspondente (p85) ou via ativação do Ras, o qual ativa diretamente p110. O p110 fosforila o fosfoinositídeo (PI) na posição D3 do anel

inositol gerando PIP3. A união do PIP3 ao domínio PH da proteína Akt representa um passo essencial e limitante na sua ativação, pois esta união promoverá a translocação do Akt para a membrana plasmática, onde será fosforilada pelas proteínas PDK1, no resíduo Thr 308, e pela PDK2, no resíduo Sr 473 (Figura 2.1). A fosforilação destes sítios é fundamental para completa ativação da proteína Akt (Hay, 2005).

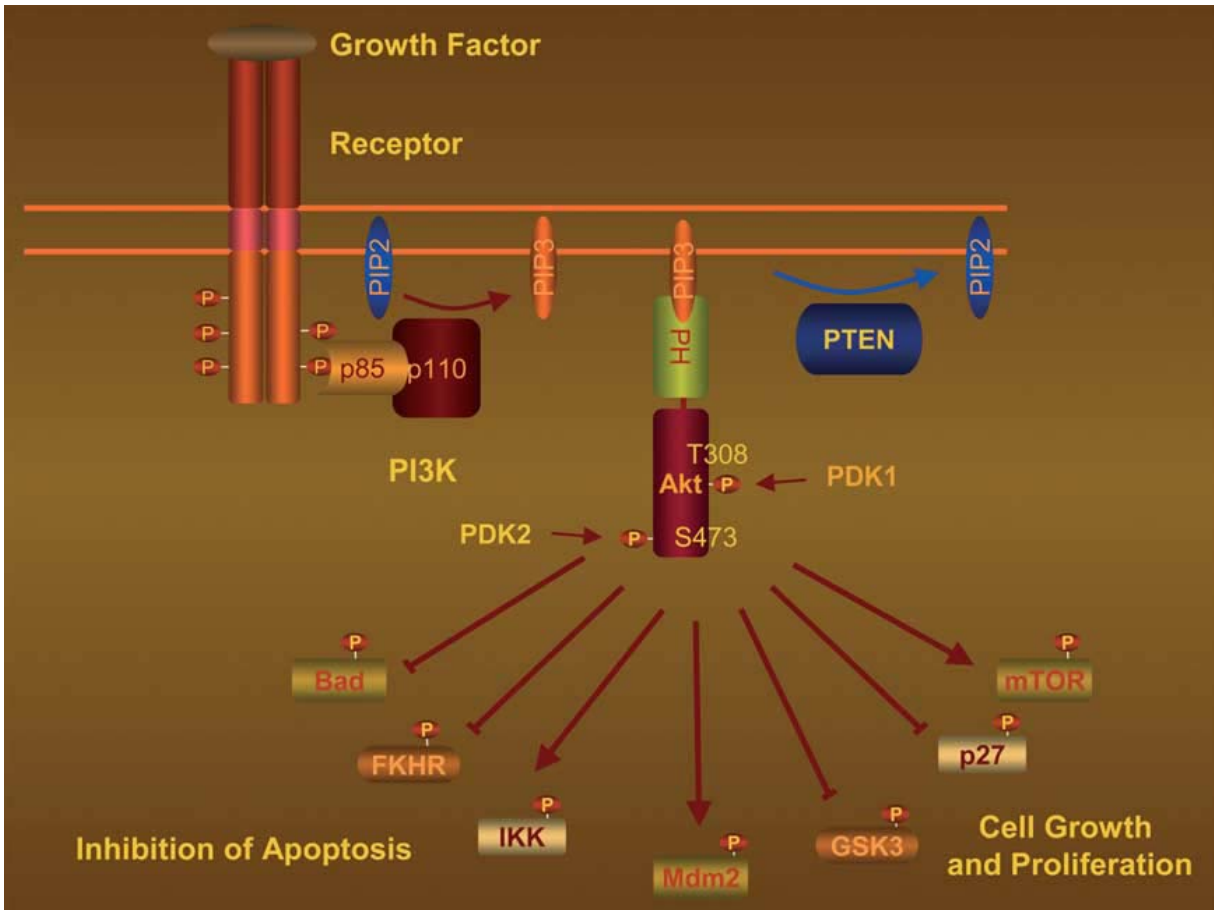

Figura 2.2 - Mecanismo de ativação e principais alvos envolvidos na via de sinalização da proteína Akt responsáveis pela inibição da apoptose e proliferação celular

A proteína Akt ativada modula a função de numerosos substratos envolvidos na regulação da sobrevivência celular, progressão do ciclo celular e crescimento celular (Vara et al., 2004).

A ativação da Akt induz diferentes mecanismos de sobrevivência celular. A proteína Akt inativa, através da fosforilação, fatores proapoptóticos como as proteínas Bad e procaspase-9, assim como membros da família Forkhead, os quais induzem a expressão de fatores proapoptóticos como o ligante Fas. Por outro lado, a Akt também induz a ativação de proteínas reguladoras de genes com

atividade antiapoptótica como; CREB e IKK, sendo este último regulador positivo da proteína NF-kB, a qual é responsável pela transcrição de outros genes que resultam na sobrevivência celular, tais como Bcl-XL, inibidor de caspase, c-Myb (Figura 2.2) (Testa e Bellacosa, 2001; Vara et al., 2004; Osaki et al., 2004)

Na via do Wnt, a inibição do GSK3 pelo Akt previne a fosforilação de moléculas de β-catenina citoplasmática, impedindo a degradação da mesma e promovendo sua translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, a β-catenina combina-se com diferentes fatores de crescimento para induzir a expressão de diversos genes, como a ciclina D1, o qual induz a progressão do ciclo celular via regulação da hiperfosforilação e inativação da proteína Rb (Osaki et al., 2004).

A proteína Akt também fosforila as proteínas P21 e P27, inibindo desta forma seus efeitos anti-apoptóticos pela retenção das mesmas no citoplasma (Gao et al., 2004). A proteína Akt é responsável algumas vezes pela síntese de proteína por, como exemplo, aumento da fosforilação de mTOR. A proteína mTOR ativada promove translação de RNAm de ciclina D1 (Muise-Helmericks et al.,1998)

Um dos principais alvos da proteína Akt é a proteína Mdm2. A ativação da proteína Akt resulta na fosforilação de Mdm2 nos sítios serina 166 e serina 186, levando a translocação do Mdm2 do citoplasma para o núcleo e diminuído em seguida os níveis celulares da proteína P53. Isto se explica pelo fato de a proteína Mdm2 nuclear promover a exportação da proteína P53 para o citoplasma onde a mesma sofrerá degradação (Mayo; Donner, 2001).

A proteína Akt têm sido apontada como uma proteína com papel central no processo de tumorigênese de diversos cânceres.

Esta importância se dá por uma grande variedade de funções exercidas através de interação com diferentes substratos. A superexpressão da proteína Akt pode alterar a homeostasia celular mediante ações, tais como: autonomia na sinalização de crescimento celular, através da hiper-responsividade a níveis normais de fatores de crescimento; insensibilidade a sinais responsáveis pela parada do crescimento, através da facilitação da entrada da proteína Mdm2 no núcleo e posterior aumento da degradação da proteína p53, também da translocação das proteínas p21 e p27 para o citoplasma e estabilização da proteína Ciclina D1/D3; inibição da morte celular programada, através da inativação de fatores pro-apoptóticos (BAD e pro-caspase 9), de fatores de transcrição (família Forkhead) e ativação de proteínas (IKK/NFkB) que levam a transcrição de gene anti-

apoptóticos; potencial replicativo ilimitado, através da atividade da telomerase pela fosforilação do hTERT(em inglês, human telomerase reverse transcription); angiogênese sustentada através da ativação de eNOS (em inglês, endothelial nitric oxide synthase); e por último, metástase e invasão tecidual através estimulação de secreção de MMP (em inglês, matrix metalloproteinase) (Testa; Bellacosa, 2001).

Todas estas ações relativas à ativação da proteína Akt, descritas até aqui, ocorrem no citoplasma das células, porém muito tem se investigado sobre a atuação do Akt de localização nuclear. Estudos têm demonstrado que a proteína Akt, após ativação na membrana, pode sofrer translocação para o núcleo. Tem sido sugerida a hipótese de translocação por meio de proteínas transportadoras, semelhante ao mecanismo utilizado pelas MAP kinases (Andjelkovic et al.,1997; Méier et al.,1999).

O papel da proteína Akt nuclear ainda é incerto, mas investigações têm demonstrado que a proteína Akt de localização nuclear está relacionada a tumorigênese e a supressão de estímulos apoptóticos, através do bloqueio de DNase ativada por caspase e inibição da condensação da cromatina (Martelli et al., 2006). Lee et al. (2008), demonstraram que a proteína Akt, quando localizada no núcleo e sob estimulação de fatores de crescimento, liga-se à fosfoproteína nucleolar B23 protegendo-a da degradação por caspase-3, causando hiper-regulação de sobrevivência celular. A proteína B23 é responsável pela biogênese de ribossomos e promoção da entrada na fase S do ciclo celular.

Outra proteína importante na via de sinalização da Akt é o fator nuclear (NF)-kB, este fator de transcrição regula a expressão de diversos componentes do sistema imune. Estes incluem citocinas pró-inflamatórias; quimiocinas; moléculas de adesão; e enzimas induzíveis como: cicloxigenase-2 e sintase óxido nítrico induzível, as quais regulam a resposta imune inata. A NFkB também regula proteínas responsáveis pela resposta imune específica, tais como: complexo de histocompatibilidade, moléculas estimuladoras cruciais para indução da fase de imunidade específica e citocinas como Interleucina-2/-12 e Interferon-γ, os quais controlam a proliferação de linfócitos e diferenciação. A desregulação do fator de transcrição NFkB pode levar ao desenvolvimento de doenças auto-imunes e inflamatórias (Yamamoto e Gaynor, 2001).

Pelo fato da proteína NFkB também regular a expressão de uma grande variedade de proteínas que inibem a apoptose e promovem a

proliferação/sobrevivência celular, também está envolvida no processo de carcinogênese (Karin et al., 2002).

A família de proteínas NFkB consiste de cinco proteínas estruturalmente relacionadas e funcionalmente conservadas: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-kB1 (p50/p105) e NF-kB2 (p52/p100). Estas proteínas formam homo e heterodímeros, nos quais as formas ativas mais comuns são p50/RelA e p52/RelA (Gilmore, 2006).

A atividade da proteína NFkB é rigorosamente regulada pela interação com a proteína inibitória IkB. Assim como o fator de transcrição NFkB, há várias proteínas IkB (ex. IkBα, IkBβ, IkBγ, IkBε) que possuem diferentes afinidades para os dímeros de NFkB. Estudos bioquímicos e determinação estrutural direta têm mostrado que as proteínas IkBs fazem múltiplos contatos com a proteína NFkB. Geralmente esta interações cobrem o sinal de localização nuclear dos dímeros de NFkB e interferem na seqüência envolvida com a união com o DNA (Gilmore, 2006).

A maioria das células apresentam a proteína NFkB na forma latente, inativa, formando complexo com a IkB no citoplasma. A literatura descreve 2 vias de sinalização principais para a ativação da proteína NFkB, as vias clássica (canônica) e alternativa (não-canônica). O fator regulador comum a essas duas vias é ativação do complexo IKK (IkB kinase) (Gilmore, 2006).

Outras vias têm sido descritas, porém permanecem com informações incompletas e pouco precisas.

Na via clássica, dímeros contendo Rel-A ou c-Rel associados a p50 encontram-se inativos no citoplasma pela interação com a IkB (IkBα). Em muitos casos, a união de um ligante ao receptor de superfície celular (ex. TNF-R, Toll-like receptor) recruta adaptadores para o domínio citoplasmático da membrana. Este aglomerado de moléculas no receptor ativa o complexo IKK, o qual fosforila a proteína IkB, levando-a a degradação por proteossomos. O NFkB livre do IkB, move-se para o núcleo onde atua como fator de transcrição de diversos genes (Figura 2.3) (Dolcet et al., 2005; Gilmore, 2006).

Na via alternativa, a ativação ocorre em grande parte devido a ativação do complexo p100/Rel-B, o qual encontra-se inativo no citoplasma. Esta via difere da via clássica apenas por certos sinais de receptores. Nela a proteína NFkB é ativada por membros da família do fator de necrose tumoral (TNF), como BAFF (B cell activating factor), que levam a indução da proteína NIK(NFKB inducing kinase), a

qual fosforila IKKα, ativando-a. A proteína IKKα fosforilada (ativada) promove a proteólise parcial e liberação de p53/RelB. Os dímeros, então, movem-se para o núcleo, onde podem ativar os genes alvos (Figura 2.3) (Suh et al., 2004; Dolcet et al., 2005; Gilmore, 2006).

Além destas duas vias descritas acima, não há dúvida da existência de outras, tal como a via 3, na qual homodímeros (p50 ou p52) entram no núcleo, onde se tornam fatores de transcrição pela interação com co-ativadores semelhantes a IKB. O mecanismo de regulação desta via permanece incerto (Figura 2.3) (Suh et al., 2004; Dolcet et al., 2005; Gilmore, 2006).

Nas três vias descritas, modificações translacionais das subunidades do NFkB podem modular sua atividade transcricional (Gilmore, 2006).

As proteínas PI3K e Akt têm sido requeridas para a ativação de NFkB, induzida por TNFα e Interleucina 1 (IL-1), através da fosforilação e ativação da subunidade p65. A proteína Akt tem sido implicada, também, na ativação de NFkB induzida pela proteína Ras através da fosforilação e ativação de IKKβ e p38, uma MAPK (mitogen-activated protein kinase II), as quais permitem a ativação de p65 e CK2 (casein kinase II) resultando na fosforilação direta da proteína IkBα. Além disso, estudos têm demonstrado que a ativação da proteína Akt, estimulada por IL-1, ocasiona fosforilação da subunidade p50 de NFkB (Li; Stark, 2002; Ravi; Bedi, 2004).

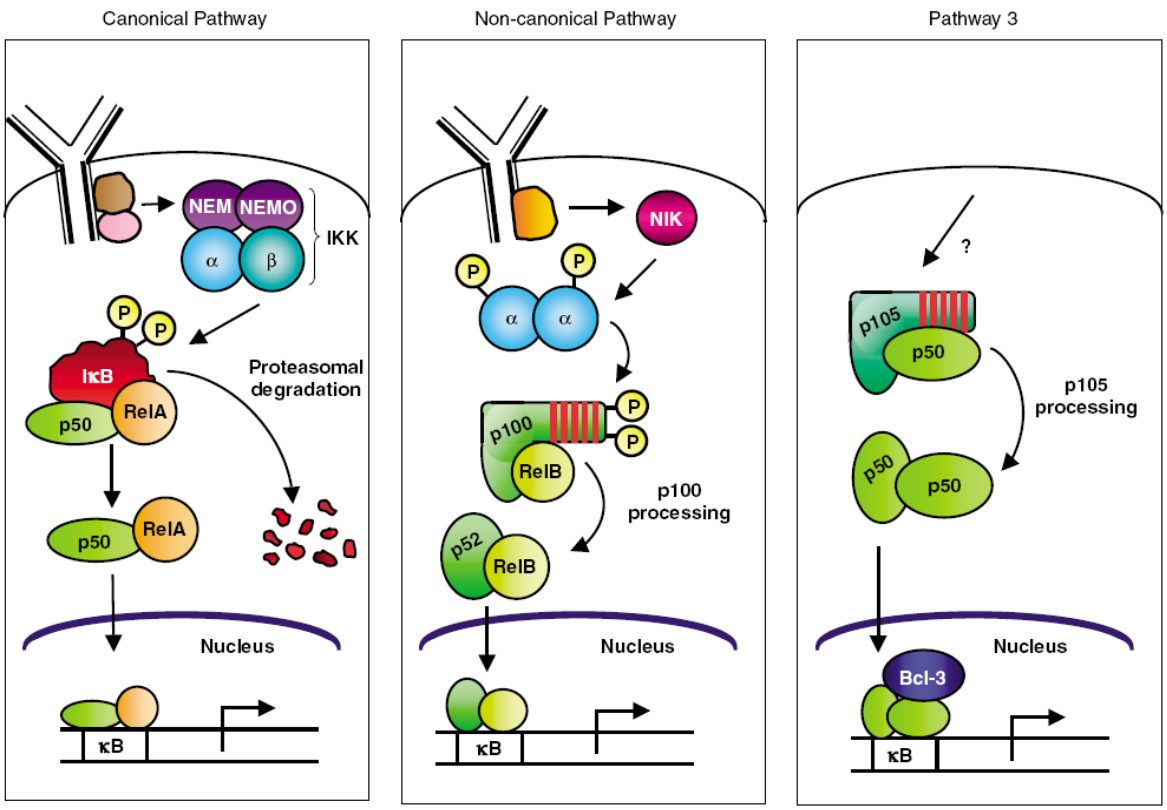

Figura 2.3 - Principais mecanismo de ativação da proteína NFkB

A ativação da proteína NFkB, atua como regulador central de respostas imunes inatas e adaptativas. Estas funções são realizadas pela indução de genes, os quais promovem inflamação, migração e ativação de leucócitos. Além destas ações a NFkB também age como um potente inibidor de apoptose, contribuindo sobremaneira no processo de carcinogênese através de diversos mecanismos (Karin et al, 2002).

Estudos têm demonstrado a participação da proteína NFkB na regulação negativa de p53 através do controle dos níveis de Mdm2, além da regulação de genes com atividades antiapoptóticas que antagonizam a ação pró-apoptótica da p53 (Tergaonkar; Perkins, 2007).

A proteína NFkB pode ativar a transcrição de vários genes envolvidos na supressão da morte celular, tanto por via intrínseca (mitocondrial), quanto por via extrínseca (receptor de morte celular). Na via extrínseca, a NFkB regula positivamente proteínas que interferem na via de receptores de morte celular. Uma destas proteínas alvo é a FLIP (FLICE-like inhibitory protein). A proteína FLIP compartilha um alto grau de homologia com a caspase-8, porém perde sua atividade de protease e compete com essa caspase pelo DISC (death-inducing signaling

complex), inviabilizando apoptose via Faz ligante. Outras proteínas da cascata de sinalização do TNFα, tais como TRAF2 e TRAF podem ser alvos da proteína NFkB. Estas proteínas podem guiar a ativação da via pró-sobrevivência pela TNF(Ravi; Bedi, 2004; Dolcet et al., 2005).

Além de ativar genes responsáveis pela supressão da morte celular, a NFkB também ativa genes que promovem a progressão do ciclo celular, pela regulação de maquinaria do ciclo celular, como ciclinas D1, D2 , D3 e clinina E, c-myc e c-mycb. A expressão de ciclina D1 induzida pela NFkB constitui um elemento chave para o desenvolvimento de glândulas mamárias e carcinogênese destas (Ravi; Bedi, 2004; Dolcet et al., 2005).

A proteína NFkB ainda induz a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, E-selectina), e proteínas envolvidas na invasão (matrix metalloproteinases). Vários fatores angiogênicos, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), são também promovidos por esta proteína, além da expressão de cicloxigenase-2 (Ravi; Bedi, 2004; Dolcet et al., 2005).

Por último, a regulação negativa da via do Akt ocorre atrvés da atuação principalmente da proteína PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromossome 10), codificada pelo gene supressor de tumor PTEN.

O PTEN é essencial para o crescimento embrionário, apresentando altos níveis celulares durante o desenvolvimento humano da pele, tireóide, sistema nervoso central e trato gastro-intestinal superior. Por outro lado, a mutação do gene PTEN está associada à síndrome de Cowden e doenças relacionadas ao desenvolvimento de lesões hiperplásicas (hamartomas) em múltiplos órgãos e o aumento do risco de desenvolvimento de transformação maligna.

A proteína PTEN possui um papel central na regulação negativa da cascata da via de sinalização da proteína Akt, conseqüentemente influencia múltiplas funções celulares, incluindo crescimento, sobrevivência, proliferação e migração celular. A desregulação da via desta proteína contribui para uma grande variedade de cânceres humanos. O PTEN representa um componente mais comumente alterado na via de sinalização PI3K/Akt nos tumores malignos humanos (Chow; Baker, 2006).

A atuação desta proteína ocorre predominantemente pela remoção de fosfato da posição D3 do PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate), assim

antagonizando a ação de PI3K, conseqüentemente se opõe a sinalização anti-apoptótica da via PI3K/Akt, modulando a apoptose e o ciclo celular.

Sob condições de stress, a proteína p53 induz, inicialmente a transcrição de Mdm2 e na impossibilidade de reparo ao DNA danificado, a p53 induz a transcrição de PTEN que conduz a célula à morte celular programada via bloqueio de p-Akt (Mayo; Donner, 2002). Logo, os efeitos da perda de expressão de PTEN são predominantemente manifestados por mudanças no número de células e pela sobrevivência destas (Chow; Baker, 2006).

Além da atuação na via da apoptose e ciclo celular, o PTEN também participa da inibição de motilidade e migração celular de forma dependente e independente da via PI3K/Akt, respectivamente. Estudos relatam a participação de PIP3 na fosforilação de FAK, proteína responsável pelo direcionamento da migração celular mediada por integrinas através da fosforilação de p130. Esta ação explica a atuação do PTEN sobre essas proteínas dependentes da via PI3K/Akt (Gu et al., 1999). De modo geral, os alvos em potencial da proteína PTEN variam de receptores tirosina quinase e moléculas sinalizadoras citoplasmáticas a fatores de transcrição no núcleo (Yin; Shen, 2008).

O papel da proteína PTEN no citoplasma já foi incansavelmente descrito na literatura, sendo a regulação negativa da via PI3K/Akt descrita como a principal ação neste local, porém tem se tornado clara a localização nuclear desta. Apesar da falta de um sinal clássico de localização nuclear, sabe-se que a proteína PTEN pode entrar no compartimento nuclear por diversos mecanismos, incluindo difusão simples, transporte ativo, exportação dependente de sinais citoplasmáticos e importação dependente de ubiquitinização (Planchon et al.,2008).

Estudos recentes têm demonstrado que a ação do PTEN nuclear difere da ação citoplasmática da mesma, pois o PTEN nuclear participa da estabilidade cromossômica, no reparo do DNA, na parada do ciclo celular e na estabilidade celular (Baker, 2007). Segundo Planchon et al. (2008), o equilíbrio entre estas funções é um fator importante para se determinar se a célula permanece benigna ou se tornará neoplásica.

Por outro lado, um estudo recente demonstrou a participação da proteína PTEN nuclear na progressão da fase G_2 do ciclo celular em células neoplásicas (Jacob et al., 2009).

2.3 Akt, MDM2, NFkB e PTEN Expressão e interação em neoplasias

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 as diversos cânceres humanos. Os marcadores 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.

A proteína Akt fosforila e regula a função de muitas proteínas celulares envolvidas em processos que incluem metabolismo, apoptose, proliferação celular e está diretamente relacionada a atuação da proteína Mdm2.

Recentes evidências indicam que a proteína Akt encontra-se constitutivamente ativa em diversos cânceres humanos. A ativação constitutiva da Akt pode ocorre devido à amplificação do gene *akt* ou como resultado de mutações em componentes da via de sinalização, os quais ativam a proteína Akt. Acredita-se que a superexpressão desta proteína promove a proliferação e o aumento da sobrevida celular, além de contribuir com a progressão do cancer (Nicholson; Anderson, 2002).

Arboleda et al. (2003), analisaram a contribuição da proteína Akt2 na progressão tumoral, através da transfecção de cDNA de Akt2 em carcinoma de mama e de ovário. A Akt2 transfectada demonstrou aumento da adesão e invasão através do colágeno IV devido a regulação positiva da integrina β1. Estes resultados indicam que o Akt2 regula os efeitos dependentes da via PI3K na adesão, motilidade, invasão e metástase *in vivo.*

Rudelius et al.(2006), investigaram o status da proteína Akt e de seus alvos downstream em linhagens celulares e blocos de linfoma de célula do manto, com a finalidade de estudar a possível participação da via do Akt na carcinogênse destes linfomas. Os achados do estudo demonstraram que a o Akt estava fosforilado em todos os casos agressivos (12 casos), em contraste com os resultados obtidos nos linfomas de baixo grau, o Akt fosforilado estava presente em apenas 5 dos 16 casos. Observaram, ainda que a expressão do p-Akt estava acompanhada da

fosforilação de proteínas downstream, incluindo Mdm2 e a inibição da via PI3K/Akt reduziu a fosforilação do Mdm2, levando a parada do ciclo celular ou apoptose.

Asano et al. (2004), analisaram oito linhagens e 17 carcinomas de pâncreas, com objetivo de investigar a possível participação da via do PI3K/Akt nestes carcinoma. Os resultados demostraram que a via do PI3K/Akt encontra-se constitutivamente ativada em carcinoma de pâncreas e esta ativação pode ser devido à expressão aberrante de um antagosnista natural desta via (MMAC/PTEN).

Rearranjos ou deleções de cromossomo afetando o lócus NF-kB2, resulta na perda de anquirina de p100 e geração de proteína p52 constitutivamente ativa. Essa condição tem sido observada em linfomas de célula T, linfomas de células B e mieloma múltiplos. Algumas leucemias linfocíticas de células B podem apresentar translocação t(14; 19)(q32;q13). Esta translocação resulta no aumento da expressão de Bcl-3 que atua como um co-ativador transcricional dos homodímeros p50 ou p52, permitindo um aumento da atividade de NFkB e sobre-expressão de seus alvos como a ciclina D1 (Dolcet et al., 2005)

Park e Kim (2007), estudaram a incidência da ativação da proteína Akt em 127 casos de carcinoma ductal invasivo de mama através na expressão imuno-histoquímica, em bloco de TMA, das proteínas p-Akt, HER-2, p53 e Ki67, correlacionando com variáveis clinico-patológicas. Os autores demonstraram que a ativação da via do Akt mostrou forte associação com a superexpressão de HER-2, sendo estes resultados consistentes com muitos estudos *in vitro,* também foi demonstrada a correlação positiva entre pAkt e receptores hormonais, a qual sugere o possível mecanismo de resistência endócrina nos cânceres de mama ER-positivo. Estes resultados também sugerem um valor prognóstico do p-Akt e sua importância na predição de resposta terapêutica em carcinoma ductal invasivo de mama.

Laezza et al. (2010), investigaram o mecanismo molecular do N^6-isopentenyladenosine (i6A) como agente anticancer em linhagem de carcinoma de mama MDA MB 231. O tratamento com i6A diminuiu a proliferação celular desta linhagem de maneira dose-dependente pela para do ciclo celular na fase G_0/G_1. Este efeito foi fortemente associado com a concomitante diminuição nos níveis de ciclina D1, ciclina E, cdk2, e aumento de p21 e p27. Além disso, i6A também induziu a morte celular por apoptose através do aumento da expressão de Bax, e diminuição nos níveis de Bcl-2 e Bcl-XL, e subseqüente ativação da via apoptótica mitocondrial. Os autores observaram que i6A suprimiu a via do NFkB nuclear e inibiu a ativação

de Akt. Os resultados deste estudo indicaram que i6A diminui a proliferação celular e induz a morte celular por apoptose em células de carcinoma de mama humano, possivelmente pela diminuição da transdução de sinais através da via de sobrevida celular Akt/NFkB.

Porém, estudos demonstraram que a ativação da proteína NFkB em carcinoma de mama é confinada, predominantemente aos subtipos estrógeno-negativos, particularmente aqueles que expressão membros da família de receptores EGF (Biswas et al., 2004; Singh et al., 2007).

Segundo Freeman et al. (2003), muitas mutações relacionadas a vários tipos de neoplasias malignas têm sido mapeadas no interior do domínio catalítico de PTEN, sugerindo que a atividade fosfatase é requerida para a supressão tumoral.

Chang et al. (2003) demonstraram que PTEN é capaz de regular negativamente a transcrição da proteína Mdm2 ao interagir com a região promotora P1, independente da ação de p53 em linhagem de carcinoma de próstata.

Backlund et al. (2003) encontraram associação entre a perda de atividade da proteína PTEN selvagem e a sobrevida em pacientes com glioblastoma. Os autores fizeram análise genética de 129 glioblastomas utilizando PCR, sequenciamento e análise microsatélite. Esses resultados foram corroborados por Zhou et al. (2003) que ao investigarem glioblastomas, através da avaliação de cDNA pelo método de PCR em tempo real, concluíram que os níveis de expressão de PTEN podem funcionar como marcadores prognósticos para esta neoplasia. Smith et al. (2001) também associaram a mutação no gen de PTEN com o prognóstico em gliomas, após analisar, através de PCR e sequenciamento de DNA 111 amostras de gliomas.

A inativação do PTEN foi primeiramente relatada em pacientes portadores da síndrome de Cowden (Dahia et al., 1997; Liaw et al., 1997). Logo depois surgiram outros relatos da inativação desta proteína em carcinomas de mama esporádicos, sem relação com a síndrome (Teng et al., 1997; Garcia et al 1999)

Yang et al. (2010), compararam o espectro de mutação do PTEN em cancer de mama e hiperplasia de tecidos mamários através da análise da amplificação por PCR de 50 casos de cancer de mama, com respectivos tecidos adjacentes, e 50 casos de lesão benigna mamária. Observaram que a mutação do PTEN é relativamente alta em pacientes com câncer de mama esporádicos e afeta o

estágio inicial do desenvolvimento deste carcinoma. Demonstraram, ainda, o efeito da mutação do PTEN na expressão silenciada da proteína PTEN, indicando o importante papel da mutação do PTEN na carcinogênese do carcinoma de mama.

A expressão nuclear da proteína PTEN tem apresentado função reguladora do ciclo celular em fases distintas, dependendo do tipo celular estudado. Segundo Ginn-Pease e Eng (2003), nas células MFC-7 de carcinoma de mama, os níveis nucleares e citoplasmáticos da proteína PTEN são flutuante de acordo com o ciclo celular. Os autores também observaram que os maiores níveis de PTEN nuclear coincidiram com as fases G0-G1 do ciclo, indicando que o PTEN nuclear apresenta um papel modulador no ciclo celular.

Jacob et al.(2009) investigaram, em linhagens de melanoma, a compartimentalização núcleo/citoplasma da proteína PTEN e sua interferência no ciclo celular. Os resultados demonstraram que a proteína PTEN de localização nuclear está envolvida na progressão da fase G2 do ciclo celular, possivelmente através de CDC2 (cyclin –dependent kinase).

Zhou et al.(2000) analisaram a localização subcelular do PTEN em melanomas primários e metastáticos. Foi observada completa perda de expressão da proteína PTEN nuclear nos melanomas metastáticos.

Apesar de muitos esforços por parte da comunidade científica em elucidar o papel da proteína PTEN nuclear, pouco se sabe o porquê proteína PTEN está regulando o ciclo celular em carcinoma de mama e ainda está envolvido na fase G2 em melanomas (Jacob et al., 2005; Baker, 2007).

Kimura et al.(2004) demonstrou uma diminuição de expressão da proteína PTEN em adenocarcinomas endometrial endometrióide que apresentavam altos níveis de receptores de estrógeno e progesterona. Além disso, observaram correlação da expressão de PTEN com a regulação do ciclo celular.

A expressão de PTEN mostrou-se diminuída em carcinomas de mama e endometriais hormônio positivos (Kappes et al., 2001). Jacob et al. (2009) sugerem que este diferente mecanismo de ação em tecidos e tumores responsivos para hormônios.

2.4 Akt, MDM2, NFkB e PTEN Expressão e interação em neoplasias de glândulas salivares

Vários estudos têm sido realizados na tentativa de se desvendar as proteínas responsáveis pela tumorigênese ou pelos diferentes comportamentos nas neoplasias de glândulas salivares.

Araújo et al. (2000), avaliaram 20 tumores de glândulas salivares menores incluindo 7 adenocarcinomas polimorfo de baixo grau de malignidade, o carcinomas adenóides císticos, 3 adenocarcinomas de células acinares e 2 adenomas pleomórficos através da expressão imuno-histoquímica da proteína Mdm2 e do status do gene p53 através da técnica de PCR. Os autores não observaram nenhuma alteração sugestiva de mutação do gene p53 (exon 5 a 8), porém observaram uma intensa expressão imuno-histoquímica para a proteína Mdm2 em todas as neoplasias analisadas. Os resultados sugeriram um mecanismo alternativo envolvido com a tumorigênese.

Schlott et al. (2001) analisaram o status do gene MDM2 e a expressão imuno-histoquímica da proteína correspondente em tumores benignos e malignos de glândulas salivares, sendo estes 6 adenomas pleomórficos, 3 tumores de warthin, 1 adenocarcinoma, 1 adenocarcinoma de células basais, 1 carcinoma mucoepidermóide, 3 carcinomas de células acinares e 2 carcinomas adenóides císticos. Os autores não observaram alteração no gene MDM2, porém foi notado o acúmulo nuclear da proteína Mdm2 em 3 tumores malignos (1 adenocarcinoma de células basais, 1 adenocarcinoma e 1 carcinoma mucoepidermóide), ao passo que nenhum tumor benigno expressou a proteína.

Roijer et al. (2002) realizaram, em caso de carcinoma adenóide cístico em estágio inicial de desenvolvimento,um estudo com o intuito de caracterizar os eventos genéticos que levam à translocação, deleção, amplificação e superexpressão do gene MDM2. Os resultados sugeriram que a amplificação e a superexpressão do Mdm2 constituem um evento genético importante, o qual pode contribuir para a transformação maligna de adenomas pleomórficos.

Mantesso et al. (2004) analisaram a expressão do RNAm do gene MDM2 através da técnica de PCR diferencial e a correlação desta com a imunoexpressão das proteínas p53 e p21, analisada por imunofluorescência em

linhagens celulares de neoplasias de glândulas salivares. Os autores observaram a superexpressão do RNAm do MDM2, na maioria da linhagens estudadas; uma marcação variável para proteína p53 nas neoplasias malignas e ausente nas benignas ; e marcação para a proteína p21 foi observada apenas nas neoplasias benignas, sendo esta restrita a poucas células. Baseado nos resultados, foi sugerido que a superexpressão do MDM2 pode estar envolvida na gênese das neoplasias de glândulas salivares e que a participação das proteínas Mdm2, p53 e p21 ocorrem de forma variada, dependendo na neoplasia em questão.

Shen e Sun (2005) investigaram a expressão de PTEN e PKB em carcinomas adenóides císticos de glândula salivar e sua correlação com dados clínicos, para isto 63 casos de CAC foram analisados pela técnica de imuno-histoquímica. Já expressão do PTEN foi observada em 36% dos CACs metastáticos, em 68,42% dos CAC primário, e em 84,21% dos tecidos não-neoplásicos vizinhos a lesão. Enquanto a expressão da proteína PKB foi observada em 96% dos CACs metastáticos, 71% dos não-metastáticos e 52.63% dos tecidos não neoplásicos vizinhos a lesão. Os autores concluíram que a expressão das proteínas PTEN e PKB pode ser relacionada com a ocorrência e progressão de CACs, podendo, ainda haver influência destas, na ocorrência de metástases.

Lima et al. (2009) avaliaram a correlação entre a expressão das proteínas Mdm2, p53, p21 e p-Akt em linhagem celular e blocos parafinados de carcinoma adenóide cístico. Os resultados demonstraram superexpressão das proteínas Mdm2 e p-Akt , variável expressão da proteína p53 e ausência de expressão para proteína p21, porém não houve diferenças estatísticas na entre os tipos histológicos. Marques et al. (2008), avaliaram as mesmas proteínas do estudo de Lima et al. (2009), em adenomas pleomórficos e mioepiteliomas e também observaram a superexpressão das proteínas Mmd2 e p-Akt, porém com ausência de expressão para as proteínas p53 e p21.

Zhang e Peng (2009) com o intuito de comparar a habilidade de angiogênese de duas linhagens metastáticas de carcinoma adenóide cístico de alta taxa de metástase (ACC-M) e baixa taxa de metástase (ACC-2), analisaram a atividade de NFkB e a expressão de VEGF nestas linhagens. Os autores observaram que as taxas de atividade da proteína NFkB e a expressão de RNAm do VEGF foram significativamente maiores na linhagem com alta taxa de metástase, além disso, a expressão do RNAm do VEGF foi diminuída pela inibição da atividade

da NFkB. Os autores concluíram que a linhagem ACC com alta taxa de metástase pode apresentar uma grande habilidade de angiogênese.

Volker et al. (2009) analisaram a expressão imuno-histoquímica de 29 carcinomas adenóide císticos (subtipo cribiforme) para as proteína p-Akt, TKTL-1 (transketolase like 1), M2PK (M2 pyruvate kinase) e GLUT-1, correlacionando com os dados clínicos. Avaliaram, também, a proliferação celular através da expressão da proteína Ki67. Os autores constataram que apenas a expressão da proteína p-Akt estava significativamente associada com o maior risco de recidiva pela análise multivariada. Mediante os resultados obtidos, sugeriu-se a possibilidade de abordagem terapêutica direcionada a inibição da via PI3K/Akt.

Sun et al. (2010) realizaram um estudo *in vivo* com verificação *in vitro* com a finalidade de investigar os efeitos da quercetina (flavonóide natural) no crescimento e apoptose de carcinoma adenóide cístico de glândula salivar. Os resultados do ensaio de MTT demonstraram que a quercetina diminui a viabilidade de ambas as linhagens metastáticas estudadas (ACC-M, ACC-2) de maneira tempo e concentração dependente. Além disso, o tratamento resultou em significativa aumento na apoptose destas células. Os dados da pesquisa revelaram que a apoptose induzida por quercetina, ocorreu através da via dependente de mitocôndria, demonstrando desta forma íntima correlação com a regulação negativa da via PI3K/Akt/IKK-α/NFkB. Os experimento in vivo, demonstrou resultados ainda mais interssantes devido a diminuição do crescimento do carcinoma adenóide cístico em camundongos nude, acompanhado pela indução da apoptose das células tumorais, supressão da translocação de NFkB, assim como regulação negativa das proteínas Akt e IKK-α. Os autores concluíram que a Quercetina pode ser um agente quimioterápico promissor pela ação reguladora sobre a via PI3K/Akt/IKK-α/NFkB.

3 PROPOSIÇÃO

Analisar a via do Akt através do estudo da expressão das proteínas PTEN e NF-kB utilizando as técnicas de imunohistoquímica, western-blotting e imunofluorescência; e a influência desta via sobre a expressão da proteína Mdm2 através da análise da co-imunoprecipitação das proteínas Mdm2/pAkt e PTEN/Akt em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer de número 171/07 (Anexo A)

O projeto também foi submetido e aprovado pelas demais instituições envolvidas no trabalho, sendo estas representadas pelo Hospital do Câncer de Pernambuco e Universidade de Sheffield (UK).

4.1 Casuística

As amostras do presente estudo são compostas por linhagens celulares e cortes de blocos parafinados provenientes de tumores benignos e malignos de glândulas salivares, e glândulas salivares normais, as quais foram usadas como controle.

Para as reações de western-blotting, imunofluorescência e co-imunoprecipitação foram utilizadas linhagens celulares derivadas de: adenoma pleomófico (AP4), carcinoma adenóide cístico (CAC2) e, como controle, foi utilizada uma linhagem de queratinócito com p53 mutante (Hacat). As localizações dos tumores estão descritas na tabela 4.1. A linhagem AP4 foi gentilmente cedida pelo departamento de Patologia Bucal da Faculdade São Leopoldo Mandic e as demais são provenientes da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Tabela 4.1 - Relação das linhagens de neoplasias de glândulas salivares

Linhagem	Neoplasia	Localização
AP4	Adenoma Pleomórfico	Parótida
CAC2	Carcinoma Adenóide Cístico	Parótida

Os casos de tumores de glândulas salivares e glândulas salivares normais, utilizados neste trabalho foram selecionados do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), do Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e da Universidade de Sheffield (UK), sendo estes blocos obtidos de biópsias ou peças cirúrgicas. Foram utilizados 45 adenomas pleomórficos, 38 carcinomas adenóide císticos, 13 carcinomas ex-adenomas pleomórficos e como controle foram utilizados 7 glândulas salivares normais. Um carcinoma epidermóide foi utilizado como controle positivo nas reações de imuno-histoquímica. A origem, localização, sexo, idade e tipo histológico (quando se aplicar) estão descritos na tabela 4.2, 4.3 e 4.4.

Cortes corados em hematoxilina e eosina dos tumores supracitadas foram submetidos a um estudo morfológico em microscopia de luz, realizado por quatro patologistas experientes para confirmação do diagnóstico. Todos os casos duvidosos foram excluídos da amostra.

Tabela 4.2 - Relação dos adenomas pleomórficos incluídos no estudo

Caso	Origem	Localização	Sexo	Idade
1	FOUSP	Palato	F	31
2	FOUSP	Parótida	F	28
3	FOUSP	Palato	M	20
4	FOUSP	Parótida	F	50
5	FOUSP	Mucosa Jugal	F	20
6	FOUSP	Parótida	F	51
7	FOUSP	Palato	F	62
8	FOUSP	Glândula Submandibular	F	16
9	FOUSP	Mucosa Jugal	M	25
10	FOUSP	Palato	M	42
11	FOUSP	Palato	M	15
12	FOUSP	Palato	F	42
13	FOUSP	Lábio	F	71
14	FOUSP	Mucosa Jugal	M	49
15	FOUSP	Palato	F	50
16	FOUSP	Palato	F	32
17	FOUSP	Palato	F	63
18	FOUSP	Lábio	M	50
19	FOUSP	Mucosa Jugal	F	67
20	FOUSP	Palato	F	19
21	FOUSP	Lábio	M	44
22	FOUSP	Maxila	F	79
23	FOUSP	Lábio	F	60
24	FOUSP	Palato	F	53
25	FOUSP	Palato	F	50
26	FOUSP	Maxila	F	29
27	FOUSP	Glândula Submandibular	F	32
28	FOUSP	Mucosa Jugal	M	50
29	FOUSP	Lábio	F	30
30	FOUSP	Palato	M	66
31	FOUSP	Mucosa Jugal	M	39
32	UShef	Parótida	M	43
33	UShef	Palato	M	62
34	UShef	Mucosa Jugal	F	61
35	UShef	Palato	F	63
36	UShef	Palato	M	55
37	UShef	Mucosa Jugal	F	69
38	UShef	Palato	F	70
39	UShef	Mucosa Jugal	F	39
40	UShef	Palato	M	23
41	UShef	Parótida	M	17
42	UShef	Parótida	F	47
43	UShef	Palato	M	60
44	UShef	Parótida	F	46
45	UShef	Glândula Submandibular	M	27

Tabela 4.3 - Relação dos carcinomas adenóides císticos incluídos no estudo

Caso	Origem	Localização	Sexo	Idade	Tipo Histológico
1	HCP	Seio Maxilar	M	63	Sólido
2	HCP	Assoalho Bucal	M	81	Cribriforme
3	HCP	Assoalho Bucal	M	71	Sólido
4	HCP	Parótida	F	53	Tubular trabecular
5	HCP	Palato	F	40	Cribriforme
6	HCP	Mucosa Jugal	F	40	Tubular
7	HCP	Mucosa Jugal	M	56	Cribriforme
8	HCP	Língua	F	48	Cribriforme
9	HCP	Língua	M	46	Cribriforme
10	HCP	Seio Maxilar	F	70	Cribriforme
11	HCP	Parótida	F	70	Sólido
12	HCP	Língua	F	68	Trabecular Tubular
13	HCP	Mucosa Jugal	F	77	Cribriforme
14	HCP	Lábio	F	44	Cribriforme
15	HCP	Seio Maxilar	F	91	Cribriforme
16	HCP	Parótida	F	24	Cribriforme
17	HCP	Língua	M	62	Tubular
18	HCP	Palato	F	47	Tubular
19	HCP	Seio Maxilar	F	66	Cribriforme
20	HCP	Parótida	M	24	Cribriforme
21	HCP	Seio Maxilar	F	60	Cribriforme
22	HCP	Região Retromolar	F	32	Tubular
23	FOUSP	Maxila	F	26	Cribriforme
24	FOUSP	Mucosa Jugal	M	45	Cribriforme
25	FOUSP	Lábio	F	70	Cribriforme
26	FOUSP	Lábio	F	45	Tubular
27	FOUSP	Assoalho Bucal	M	67	Tubular
28	UShef	Palato	M	49	Tubular
29	UShef	Palato	F	66	Tubular
30	UShef	Maxila	F	84	Sólido
31	UShef	Palato	F	26	Sólido
32	UShef	Maxila	F	48	Cribriforme
33	UShef	Glândula Submandibular	F	5	Tubular
34	UShef	Maxila	F	68	Sólido
35	UShef	Maxila	M	31	Tubular
36	UShef	Lábio	F	33	Cribriforme
37	UShef	Maxila	M	62	Sólido
38	UShef	Língua	M	48	Sólido

Tabela 4.4 - Relação dos carcinomas ex-adenomas pleomórficos incluídos no estudo

Caso	Origem	Site	Sex	Age
1	UShef	Parótida	F	46
2	UShef	Parótida	M	60
3	UShef	-	M	55
4	UShef	Lábio	F	66
5	UShef	Parótida	F	60
6	UShef	-	F	51
7	UShef	Parótida	M	43
8	UShef	Glândula Submandibular	F	47
9	UShef	Tuberosidade Maxilar	F	51
10	UShef	Glândula Submandibular	F	45
11	UShef	Glândula Submandibular	F	80
12	UShef	Língua	M	59
13	UShef	Parótida	M	62

4.2 Cultivo Celular

Todos os procedimentos do cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar para 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 cm^2, 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 CO_2 . Após as células aderirem, o meio de cultura foi trocado, dentro de um período de 24 horas, para que os efeitos citotóxicos do di-metil sulfóxido (DMSO-Sigma) não produzirem qualquer alteração nas células. O crescimento das células foi monitorado em microscópio invertido de fase, e o meio de cultura trocado sempre de acordo com o metabolismo celular, mas não ultrapassando três dias consecutivos. O método visual foi utilizado para verificar a necessidade de troca de meio de cultivo com a utilização de microscópio invertido de fase (Zeiss- Axiovert 25- Carl Zeiss, Oberochen, Alemanha) e aspectos como: vitalidade celular e mudança na coloração do meio também foram levados em consideração.

Após atingirem sub-confluência (75% do fundo da placa aproximadamente), 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) 0,25% com EDTA 1mM (Sigma) durante aproximadamente 3 a 5 minutos, dependendo do tipo celular, em temperatura de 37° C. O 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 ressuspendido em meio de cultura fresco e alíquotas distribuídas em novas placas para novo crescimento celular.

4.3 Western Blotting

Para o estudo da expressão das proteínas, foi realizada a extração das proteínas das células cultivadas. Após a sub-confluência (75% da área cultivável aproximadamente), o meio foi removido e as células, lavadas 2 vezes com PBS a frio e colocadas sobre o gelo (4° C). Foi adicionado 0,5 ml/placa de tampão RIIPA com inibidor de protease e as células foram incubadas por 10 minutos a 4° C e sob agitação. As placas foram raspadas e o lisado, então, centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi aliquotado e estocado a - 80° C.

Quantificaram-se as proteínas dos lisados através do método do ácido biocinconínico (BCA Protein Assay Reagente Kit-Pierce) que tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre resultando na redução do mesmo, formando o complexo de peptídeos com cátion cuproso. Por sua vez, o ácido biocinconínico reage com o cátion cuproso, formando o complexo BCACu+, produzindo uma cor púrpura que é lida no espectofotômetro, no comprimento de onda de 562nm. Ou seja, quanto mais intensa for a cor púrpura, ocorrerá mais absorção de luz, significando maior quantidade de proteína.

As amostras foram, então, analisadas por western-blotting, que será descrito a seguir.

A mesma quantidade de proteína total foi utilizado nos grupos estudados, assim pôde-se comparar a expressão das proteínas analisadas nas linhagens e estudo. As alíquotas previamente quantificadas foram fervidas por 5 minutos com tampão de amostra para a desnaturação das proteínas (sample buffer), contendo 3% de dodecil sulfato e sódio (SDS), 150 ml tris pH 6.8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0.01% de azul de bromofenol. Em seguida, foi aplicado 20µg de proteína total com o 6µg tampão de amostra por canaleta, as quais foram empilhadas em gel de empilhamento (preparados com 0.15M tris, 30% bis-acrilamida, 10% SDS, 20% persulfato de amônia e TEMED), separadas em gel de poliacrilamida 10% (Tabela 4.5).

Para a eletroforese foi utilizada tensão de 120V e corrente elétrica de 100 mA por 180 minutos utilizando-se como padrão de peso molecular o Kaleidoscope Prestained Standards (Biorad).

Tabela 4.5 - Volume de reagentes utilizados no gel 10% acrilamida com SDS

	Gel de Separação 10%	**Gel de Empilhamento**
Água Deionizada	16.1 ml	12 ml
Acrilamida	13.3 ml	2.66 ml
Separating Buffer	10 ml	-
Stacking Buffer 4x	-	5ml
SDS 10%	0.4 ml	0.2 ml
Persulfato de Amônia	400 µl	200 µl
TEMED	26.6 µl	20 µl

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (Amersham) foi realizada por eletro-transferência úmida com utilização do tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39 mM Glicina, 20% Metanol; pH 8.3) como recomendado pelo fabricante e foi utilizada uma tensão de 100V e corrente elétrica de 70 mA por 180 minutos. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio.

Para o bloqueio dos sítios inespecíficos de ambos anticorpos (PTEN e NFkB) foi utilizada solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST por 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, o anti-soro de interesse (PTEN e NFkB) diluído em solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST, logo depois, incubado durante 60 minuto em temperatura ambiente sob agitação (Tabela 4.6). Após o período de incubação, realizaram-se 3 lavagens de 10 minutos em TBST para remoção do anticorpo não adsorvido. O anticorpo secundário (conjugado com peroxidase) foi, então, aplicado por 45 minutos e depois a membrana foi lavada 2 vezes com TBST por cinco minutos e 2 vezes com PBS 1x.

Tabela 4.6 - Relação de anticorpos utilizados no western-blotting

Soro	Tipo	[ ]	Procedência	Clone	Incubação
PTEN	Monoclonal	1:50	Santa Cruz	A2B1	90 min
NFkB	Policlonal	1:100	Zymed	P65	90 min

A revelação da reação foi realizada pelo método colorimétrico, através da utilização do kit Opti 4CN (Bio-rad). Foram utilizados 0.25 ml para cada cm^2 da membrana. Para cada 10 ml do diluente preparado adicionou-se 0.2 ml de substrato, logo depois a solução foi deixada em contato com a superfície da membrana por 45 minutos, seguida de lavagem 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 (Tabela 4.6).

Como controle positivo das proteínas foi utilizada a linhagem Hacat, a qual apresenta superexpressão de ambas as proteínas estudadas (PTEN e NFkB).

Como controle da quantidade total de proteínas aplicada 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 gráficos, 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 dos western-blotting foram analisados estatisticamente através do programa BioEstat 4.0. utilizando-se o método Mann-Whitney.

4.4 Imunofluorescência

As linhagens AP4 e CAC2 foram submetidas à reação de imunofluorescência com os anticorpos contra as proteína PTEN e NFkB.

Para essa técnica, as células foram plaqueadas sobre lamínula de vidro e até o momento da reação, cuidados da maneira descrita anteriomente (cultivo celular). 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 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 permanecessem imersa por 30 minutos. Após esse período, procederam-se 4 novas lavagens em PBS.

Os anticorpos primários foram diluídos em PBS + BSA a 1% nas concentrações e tempo de incubação descritos na tabela 4.7. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas novamente com PBS.

Tabela 4.7 - Relação de anticorpos primários utilizados na imunofluoresência

Soro	Tipo	[ ]	Procedência	Clone	Incubação
PTEN	Monoclonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology	A2B1	60 min
NFkB	Policlonal	1:50	Zymed	P65	60 min

Após a lavagem para remoção do anticorpo primário, foi incubado o anticorpo secundário conjugado com fluoresceína (Novocastra laboratories Ltda-UK) na concentração de 1:150 por 45 minutos em temperatura ambiente e em câmera 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 microscopia invertida de fase. A documentação foi realizada por captura digital.

As proteínas estudadas foram analisadas em relação à expressão, à localização e ao padrão de marcação.

4.5 Co-imunoprecipitação

Pesquisas anteriores, do nosso departamento, já demonstraram a presença das proteínas Akt e Mdm2 em localização nuclear em ambas linhagens estudadas. Logo, com intuito de investigar uma possível relação Akt/Mdm2 e Akt/PTEN, realizou-se a precipitação para Akt e posterior análise da conjugação com o Mdm2 e PTEN.

Com esta finalidade, foram preparados lisados concentrado através da tripsinização e centrigugação das células imersas em tampão de lise.

As células de carcinoma adenóide cístico (CAC2) foram cultivadas como descrito acima em frascos de 690ml e 150cm^2 de área cultivável. As células foram, então tripsinizadas, centrifugadas e foi adicionado 0,3 ml/frasco de tampão RIIPA com inibidor de protease. Logo depois, as células foram incubadas por 10 minutos a 4° C sob agitação esporádica. Em seguida, os lisados foram centrifugadas a 13.000rpm por 20 minutos a 4° C.

O extrato protéico foi quantificado através do método ácido biocinconínico (como descrito para western blotting) para o preparo da amostra de 1mg de proteína. Foram adicionadas à amostra 10µl de inibidor de protease; 4µg de anticorpo p-Akt (Santa Cruz Biotechnology); tampão Anita, até completar o volume de 1ml; e foi deixado incubando overnight, a 4°C sob agitação.

No outro dia, realizou-se o preparo de 25µl de proteína-G-Sepharose (Sigma-Aldrich) e adicionou-se a este o extrato protéico com anticorpo incubado no dia anterior. Logo depois, foi deixado incubando por 1h, a 4°C sob agitação. Após a incubação, o tubo foi centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm e o sobrenadante recolhido para ser utilizado como controle da reação (Figura 4.1). O precipitado foi lavado 3 vezes com o tampão de Anita e depois foi adicionado 20µl tampão de amostra. As amostras foram fervidas por 5 min e o sobrenadante recolhido para serem analisados por western blotting. O western blotting foi realizado da mesma forma como descrito acima, sendo utilizado como controle da reação o sobrenadante (livre de p-Akt) recolhido após incubação da proteína-G-sepharose.

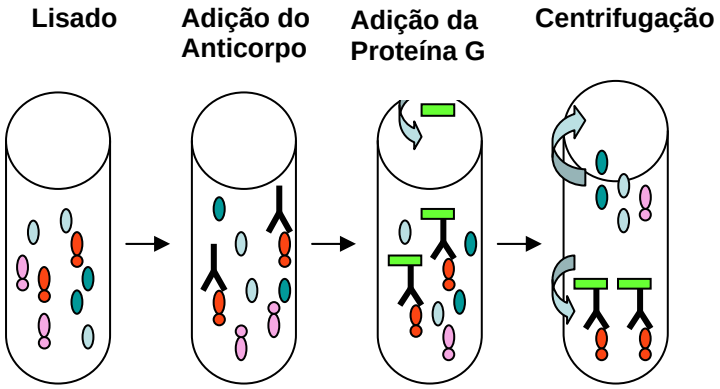

Figura 4.1 - Desenho esquemático da técnica de co-imunoprecipitação

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi submetida à fase de bloqueio dos sítios inespecíficos através da utlilização solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST por 2 horas à temperatura ambiente e sob agitação. Em seguida, os anti-soros de interesse (Mdm2 e PTEN ,Santa Cruz Biotechnology) diluído em solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST, foi incubado durante 60 minutos em temperatura ambiente sob agitação. Após o período de incubação, realizaram-se 3 lavagens de 10 minutos em TBST para remoção do anticorpo não adsorvido. 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 e 2 vezes com PBS 1x. Os dados dos anticorpo e tempo de incubação estão descrito na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Co-imunoprecipitação : anticorpos, concentração e tempo de incubação

Soro	Tipo	[ ]	Procedência	Clones	Incubação
p-Akt	Monoclonal	1:200	Santa Cruz Botechnology	Sr473	Overnight
PTEN	Monoclonal	1:200	Santa Cruz Biotechnology	A2B1	90 min
NFkB	Policlonal	1:500	Zymed	P65	90 min

A revelação da reação foi realizada pelo método colorimétrico, através da utilização do kit Opti 4CN (Bio-rad). Esta reação produziu uma coloração enegrecida nas bandas positivas para o anticorpo primário de interesse.

Como controle da reação foi realizado o stripping da membrana através da imersão da membrana de nitrocelulose em metanol por 10 minutos, seguido de bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA 1% em TBST por 2 horas. Para confirmação da presença do anticorpo na amostra precipitada e a ausência no controle (sobrenadante), foi incubado o anticorpo p-Akt por 60 minutos em temperatura ambiente sob agitação e revelado posteriormente através do mesmo método descrito anteriormente.

4.6 Tissue Micro Array

A técnica de tissue micro array (TMA) consiste da coleta de pequenos cilindros de tecido de blocos doadores e a inserção dos cilindros em blocos receptores.

A presente pesquisa apresenta 4 grupos de TMA, sendo estes representados por 4 blocos compostos de adenoma pleomórfico, carcinoma adenóide cístico, carcinoma ex-adenoma pleomórfico e o grupo controle de glândulas salivares normais. Em cada bloco foram incluídos um caso de carcinoma epidermóide e um caso de glândula salivar normal, como controles positivos e negativos, respectivamente, das reações (Figura 4.2). Em cada bloco foram incluídas pelo menos duas amostras de um mesmo caso para minimizar as falhas inerentes à técnica e garantir que todos os tumores estivessem representados na reação por pelo menos um disco.

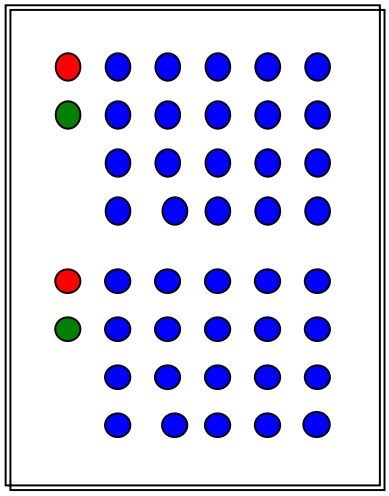

Figura 4.2 – Distribuição esquemática dos cilindros em um bloco receptor do TMA. Os círculos vermelhos representam os controles positivos; os verdes, os controles negativos; e os azuis, os tumores ou grupos controle do estudo

Para a confecção dos blocos de TMA as lâminas coradas em H.E dos tumores previamente selecionados, foram analisadas e uma região específica da lesão, escolhida para fazer parte do bloco receptor de cada grupo. As áreas foram selecionadas por 3 experientes patologistas.

As áreas selecionadas foram circundadas nas lâminas de H.E, as quais serviram como guia para a remoção do cilindro na região correspondente do bloco.

Foram removidos cilindros de 2 mm de diâmetro de cada região escolhida para fazer parte do estudo. Imediatamente antes da remoção dos cilindros, foram realizadas perfurações também cilíndricas nos blocos receptores para receber os cilindros removidos dos blocos doadores (Figura 4.3). Os cilindros foram distribuídos inicialmente na direção horizontal e logo depois foram sendo colocados verticalmente à medida que atingiam as margens de segurança do bloco (6mm das margens do bloco). A distância entre os cilindros foi de no mínimo 2 mm em todas as direções. Após a inserção de todos os cilindros e suas respectivas repetições, os blocos receptores foram colocados em estufa de 37° C por 30 minutos com a finalidade de tornar a parafina um pouco maleável para a posterior planificação da superfície. Em seguida, os blocos foram planificados através da compressão manual de uma lâmina de vidro contra a superfície do bloco.

Os blocos seguiram para resfriamento sob superfície de blocos de gelo durante 15 minutos, logo depois foram cortadas lâminas de 6µm de espessura de cada bloco de TMA através de cortes em micrótomos. As lâminas de parafina foram esticadas em banho Maria, estendidas em lâminas de vidro e coradas por HE. Foram realizados cortes seqüenciais até que todos os discos correspondentes aos casos em estudo estivessem presentes na lâmina. Após a verificação em HE, foram feitos cortes de 3 µm de espessura para as reações de imuno-histoquímica.

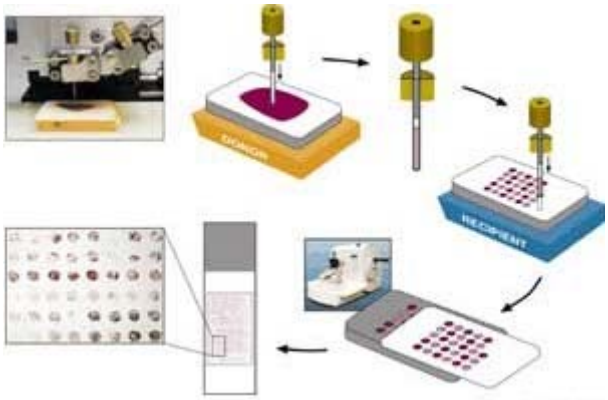

Figura 4.3 – Imagem esquemática do processo de preparação dos blocos receptores e das lâminas para o TMA (http://www.microarraystation.com/tissue-microarray/)

4.7 Imuno-histoquímica

A expressão imuno-histoquímica das proteínas PTEN e NFkB foi obtida através da técnica da polímero marcado com peroxidase. Os blocos de TMA foram seccionados com a espessura de 3 µm e estendidos em lâminas de vidro silanizadas. Foi feita 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. Logo depois, foi realizada a lavagem em água destilada e nas lâminas foram feitos os tratamentos de recuperação antigênica.

A recuperação antigênica das proteínas PTEN e NFkB foi realizada com EDTA (10mM, pH 6.0) em banho-maria a 95ºC durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos, seguidas por 2 banhos em água deionizada.

Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com 2 banhos de 15 minutos em solução de H_2O_2 (6%) e metanol. Os cortes foram lavados novamente por 10 minutos em água destilada 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 que foram utilizados estão descritos na Tabela 4.9. As reações para os anticorpos PTEN e NFkB foram realizadas manualmente e os anticorpos foram diluídos em solução diluente para anticorpos (Dakocytomation Antibody Diluent) .

Tabela 4.9 - Imunoistoquímica : anticorpos, concentração e tempo de incubação

Soro	Tipo	[ ]	Procedência	Clones	Incubação
PTEN	Monoclonal	1:200	Santa Cruz	A2B1	90 min
NFkB	Policlonal	1:500	Zymed	P65	60 min

Após a incubação dos anticorpos primários, foi feito o tamponamento com 2 banhos em TRIS pH 7,4 e incubação do polímero de alta sensibilidade (DAKO ADVANCE HRP) por 30 minutos. Em seguida foi realizada a lavagem em TBST pH 7,6 (2 banhos).

Para a reação de revelação o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St Louis, MO/USA) foi utilizado. 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 Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA), para exame ao microscópio de luz.

Foram utilizados como controle positivo para o PTEN e NFkB 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 500 células em cada caso, através da escolha de campos aleatórios em regiões mais representativas da lesão.

5 RESULTADOS

5.1 Western Blotting

Esta técnica tem como finalidade a quantificação da proteína NFkB e PTEN na linhagens CAC2 e AP4. Para isso, utilizou-se 20 µg de proteína total em todas as amostras, permitindo desta forma, a comparação da quantidade das proteínas entre as linhagens em estudo e a linhagem controle, a qual sabidamente superexpressa ambas as proteínas estudadas. A semelhança entre os volumes de proteína total entre as amostras e o controle, foi confirmada através da expressão da proteína β-actina (Figura 5.1)

Em relação à proteína NFkB, pôde-se observar superexpressão nas linhagens CAC2 e AP4, da mesma forma que observada na linhagem controle (Hacat) (Figura 5.1). O resultado do teste estatístico comprovou a superexpressão da proteína e mostrou que não havia diferenças estatísticas entre as linhagens em estudo, quando comparada a controle (Tabela 5.1).

A proteína PTEN também se mostrou superexpressa nas linhagens CAC2 e AP4, de forma semelhante à linhagem controle (Hacat) (Figura 5.1). Este resultado também foi comprovado pelas análises estatísticas das triplicatas, as quais não revelaram diferenças estatísticas entre as linhagens em estudo, comparadas com a controle (Tabela 5.1).

Para melhor efeito de comparação, as médias dos valores das triplicatas encontram-se demonstradas no gráfico 5.1.

A análise estatística das triplicatas demonstrou que não havia diferenças estatísticas ($p \geq 0.05$) entre as linhagens em estudo (CAC2 e AP4) e a linhagem controle (Hacat) (Tabela 5.1), a qual sabidamente superexpressa ambas as proteínas, logo se pode concluir que as linhagens CA2 e AP4 superexpressam as proteínas NFkB e PTEN.

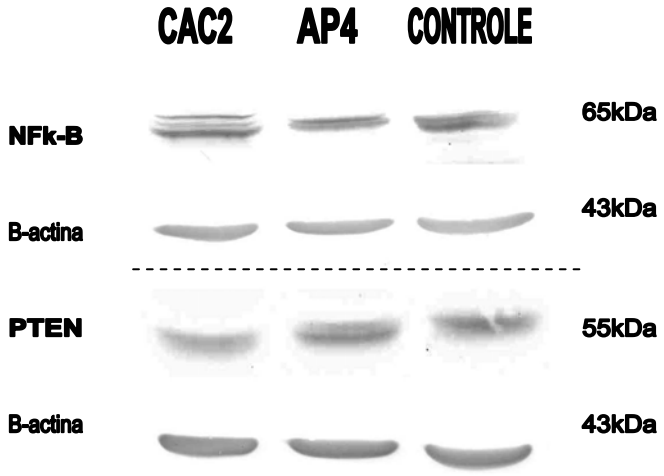

Figura 5.1 - Expressão das proteínas NFkB e PTEN, comparadas a expressão da proteína β-actina nas linhagens de CAC2, AP4 e linhagem controle (Hacat)

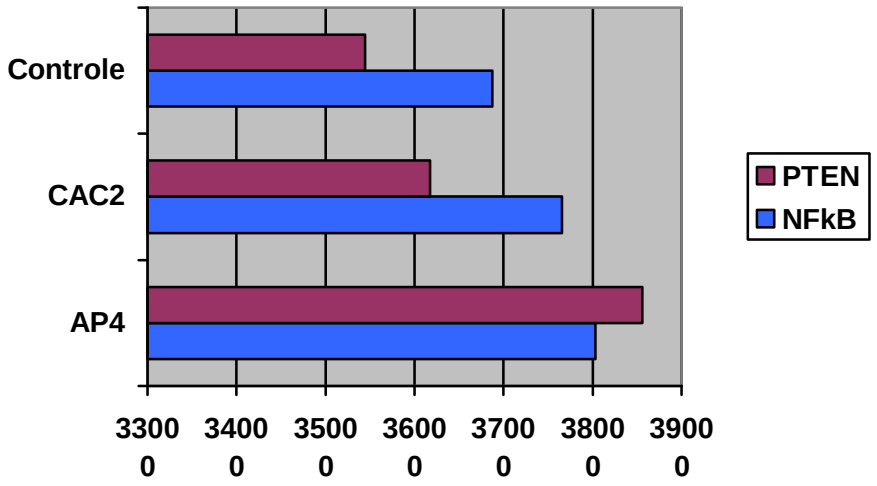

Gráfico 5.1 - Média dos valores obtidos da quantificação das bandas de western blotting. Expressão das proteínas NFkB e PTEN nas linhagens CAC2 e AP4, comparadas a expressão na linhagem controle

Tabela 5.1 – Análise estatística dos resultados obtidos pelas leituras das bandas (triplicata) nas linhagens em estudo, comparadas com a linhagem controle

	CAC2	Controle	p^a	AP4	Controle	p^a
PTEN	36172	35446	0.5	38561	35446	0.5
NFkB	37657	36876	0.5	38031	36876	0.8

Valor de p obtido pelo teste *U* de Mann-Whitney

5.2 Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência têm como objetivo identificar expressões das proteínas NFkB e PTEN nas linhagens; e as suas respectivas localizações celulares.

A proteína NFkB apresentou-se expressa quase exclusivamente no citoplasma de ambas linhagens (CAC2 e AP4) (Tabela 5.2). Na linhagem CAC2 a expressão foi observada em localização perinuclear, predominantemente, e raramente pôde ser detectada no núcleo das células, enquanto na linhagem AP4 a expressão foi observada de forma uniforme apenas no citoplasma (Figura 5.2).

A proteína PTEN mostrou-se expressa predominantemente no núcleo das células da linhagem CAC2, com pouca expressão citoplasmática, enquanto na linhagem AP4 a proteína foi observada exclusivamente no citoplasma destas (Tabela 5.2 e Figura 5.2).

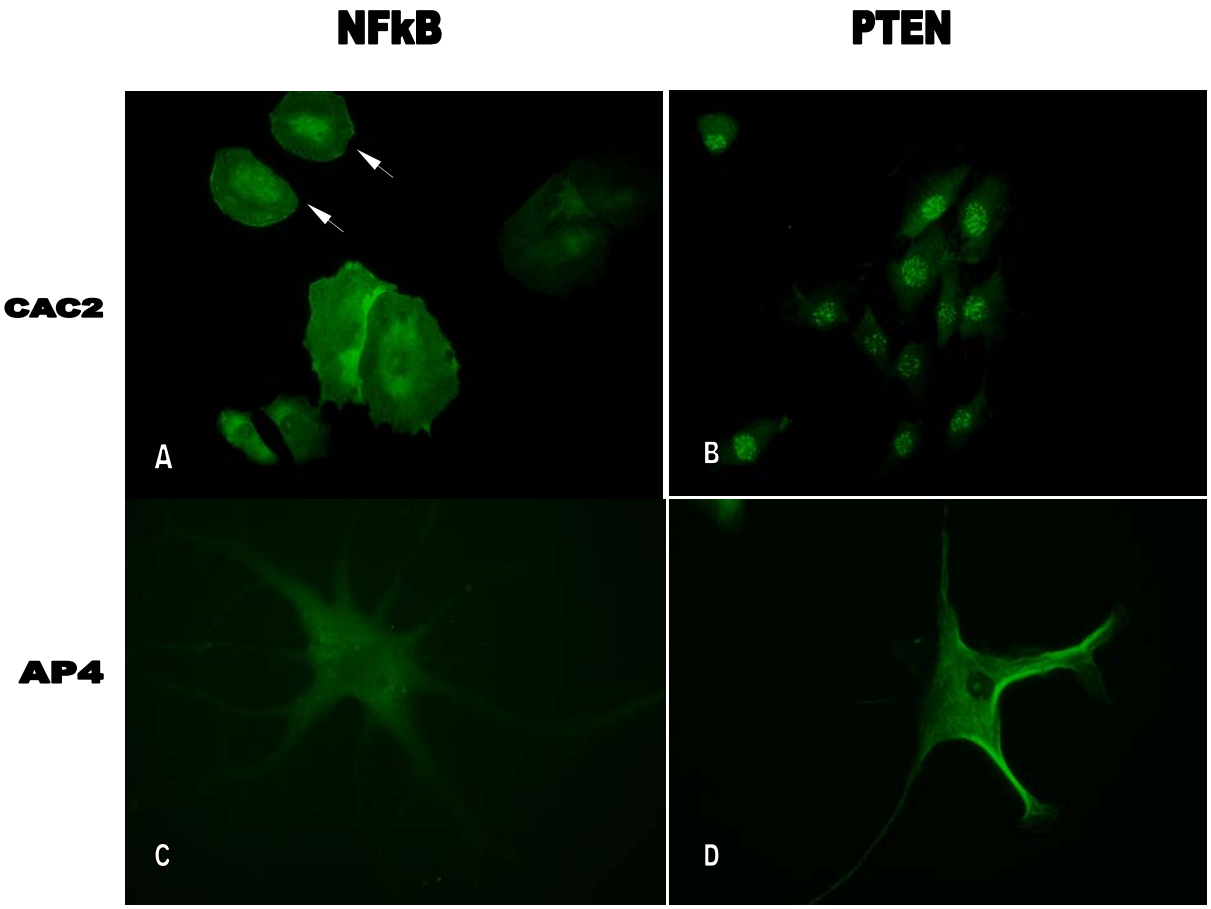

Figura 5.2 – Imunoexpressão das proteínas NFkB (A e C) e PTEN (B e D) nas linhagens AP4 e CAC2. A- Forte expressão citoplasmática de NFkB e discreta nuclear (setas) na linhagem CAC2, sendo esta última expressa em poucas células; C- Expressão apenas citoplasmática de NFkB na linhagem AP4; B- Forte expressão nuclear e discreta citoplasmática de PTEN em CAC2; D- Forte expressão apenas citoplasmática de PTEN na linhagem AP4

Tabela 5.2 - Localização da expressão dos anticorpos NFkB e PTEN nas reações de imuofluorescência

Linhagem	NFkB	PTEN
CAC2	+C (poucas +N)	+N
AP4	+C	+C

+C (expressão positiva no citoplasma), +N (expressão positiva no núcleo).

5.3 Co-imunoprecipitação

O método de co-imunoprecipitação permite a investigação de possíveis interações protéicas diretas, através da precipitação de uma das proteínas de interesse e posterior análise de conjugação a outras.

Após a precipitação da proteína p-Akt, o sobrenadante foi utilizado como controle para a presença das outras proteínas, sendo este um lisado da mesma linhagem, porém livre da proteína p-Akt e seus possíveis conjugados.

Em seguida, foi realizado o western blotting para analisar a presença de Mdm2 e PTEN, tanto no lisado composto apenas pela proteína p-Akt e seus conjugados (precipitado), quanto no lisado livre de p-Akt (sobrenadante).

Os resultados demonstraram ausência de bandas quando incubados os anticorpos Mdm2 e PTEN no lisado precipitado com p-Akt e a presença das bandas referentes às proteínas Mdm2 e PTEN no lisado livre de p-Akt e seus conjugados (sobrenadante) (Figura 5.3).

Apenas para ratificar a presença da proteína p-Akt em níveis detectáveis no precipitado, foi realizado o *stripping* de ambas as membranas, e incubado o anticorpo p-Akt (Figura 5.3).

O conjunto destas informações obtidas pela técnica de co-imunoprecipitação, demonstrou a ausência de ligação direta entre as proteínas Akt e Mdm2, e entre Akt e PTEN.

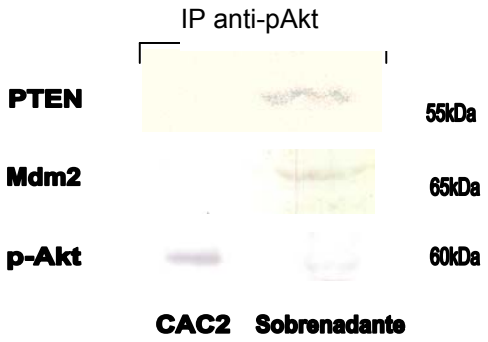

Figura 5.3 - Expressão das proteínas PTEN e Mdm2 no lisado precipitado para p-Akt e no lisado livre p-Akt (sobrenadante)

5.4 Imuno-histoquímica

Foram confeccionados quatro blocos de TMA, sendo estes representados por quatro grupos distintos (adenoma pleomórfico, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, carcinoma adenóide cístico e glândula salivar normal) (Figura 5.4). Logo depois, foi realizado o estudo da expressão imuno-histoquímica das proteínas NFkB e PTEN em casos originados de 45 adenomas pleomórfico, 38 carcinomas adenóides císticos e 13 carcinomas ex-adenomas pleomórficos; os quais tiveram as expressões comparadas com 7 glândulas salivares normais.

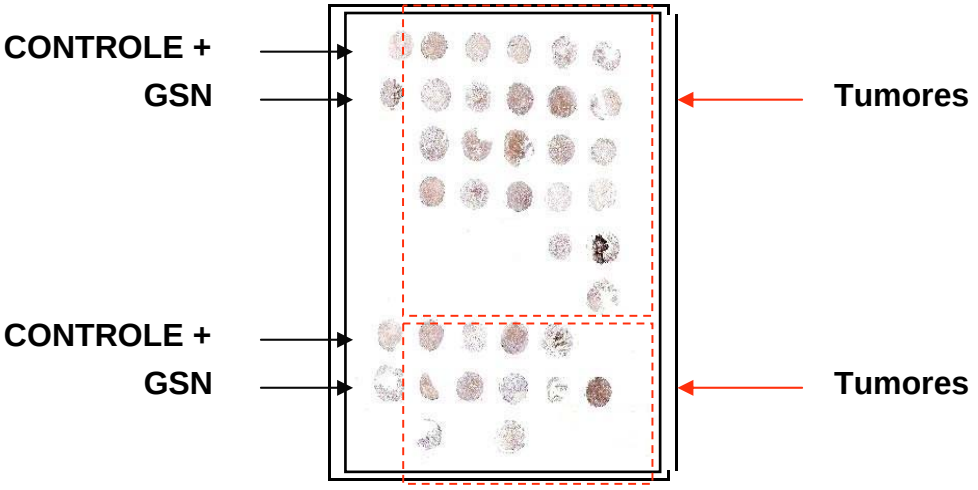

Figura 5.4 - Exemplo de Tissue microarray com 38 cilindros. Estão incluídos neste corte controle positivo, glândula salivar normal e 19 diferentes casos de CXPA. GSN (glândula salivar normal); Controle +(carcinoma epidermóide); Tumores (amostras)

As expressões foram classificadas como negativa (<10%), fraca (10 a 25%), moderada (25 a 50%) e intensa (>50%), baseadas no total de citoplasmas e núcleos positivos dentre as 500 células contadas em cada amostra.

A análise da expressão da proteína NFkB demonstrou moderada marcação, exclusivamente citoplasmática para a maioria das glândulas salivares normais (Figura 5.5), com média de expressão de 60% dos citoplasmas marcados (Tabela 5.3). Nos adenomas pleomórficos observou-se intensa expressão da proteína citoplasmática (Figura 5.5), com média de 90.6% dos citoplasmas marcados, porém a expressão nuclear foi considerada negativa (Tabela 5.3).

Os carcinomas analisados também exibiram intensa expressão para o NFkB (Figura 5.5), porém com médias de marcação mais altas que o adenoma pleomórfico. Os carcinomas adenóides císticos apresentaram média de 93.2% de citoplasmas marcados e os carcinomas ex-adenomas pleomórficos 97.8%. As médias das expressões nucleares foram consideradas negativas para ambos carcinomas, assim como observado nos adenomas pleomórficos e glândulas normais (Tabela 5.3).

Apesar das médias serem semelhantes entre os tumores investigadas e as glândulas salivares normais, os testes estatísticos revelaram que a expressão da proteína NFkB apresentou um padrão estatisticamente diferente de marcação entre os tumores analisados e as glândulas salivares normais ($p<0.05$).

Não foram observadas diferenças significativas na expressão da proteína NFkB entre os diferentes padrões histológicos dos carcinomas adenóides císticos (Gráfico 5.3 e Figura 5.7).

Com relação à proteína PTEN, as glândulas salivares normais não exibiram expressão para esta proteína (Figura 5.6), sendo as médias de marcação citoplasmática inferiores a 10% e a nuclear igual a zero. Nos adenomas pleomórficos também foram observadas médias de expressões negativas para o PTEN (6%), apesar de serem estatisticamente diferentes das glândulas salivares normais. A marcação citoplasmática apresentou-se intensa (96%), diferente das glândulas normais que foram consideradas negativas (Tabela 5.4).

Os carcinomas investigados apresentaram intensa expressão para proteína PTEN . Em relação às médias de marcação, a expressão citoplasmática de ambas lesões foi intensa, porém a expressão nuclear foi considerada franca nos

carcinoma ex-adenomas pleomórficos e moderada nos carcinomas adenóides císticos (Figura 5.6 e Tabela.5.4).

Houve diferença na expressão nuclear da proteína PTEN entre os diferentes tipos histológicos. Os padrões sólido e tubular apresentaram média de expressão de 42,4% e 42,6% respectivamente, sendo estes valores de marcação considerados moderado, enquanto o padrão cribriforme apresentou média de expressão nuclear de 61%, sendo considerada uma marcação intensa.

Os resultados dos testes estatísticos da expressão da proteína PTEN nos tumores foram considerados significantes ($p<0.05$)(Tabela.5.4).

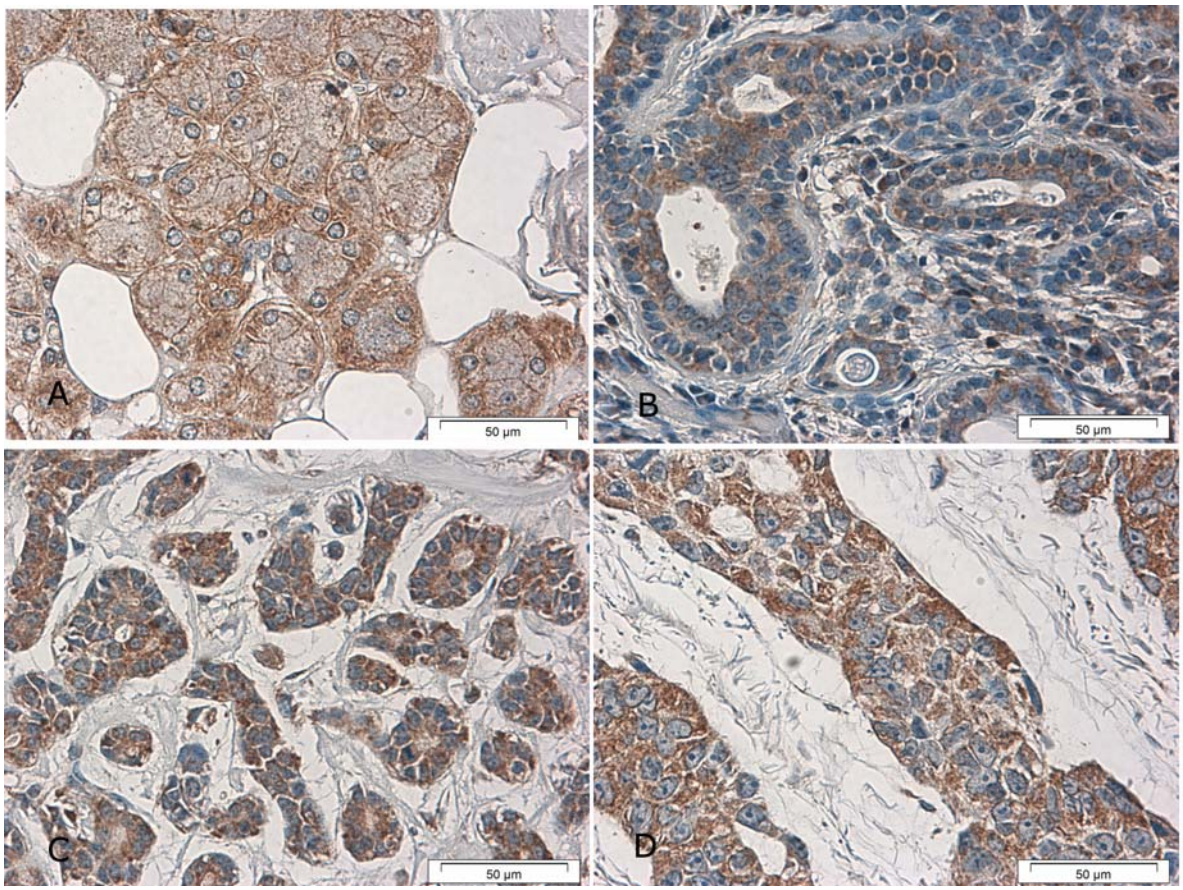

Figura 5.5 -. Expressão citoplasmática da proteína NFkB em glândula salivar normal (A), em adenoma pleomórfico(B), em carcinoma adenóide cístico (C) e em carcinoma ex-adenoma

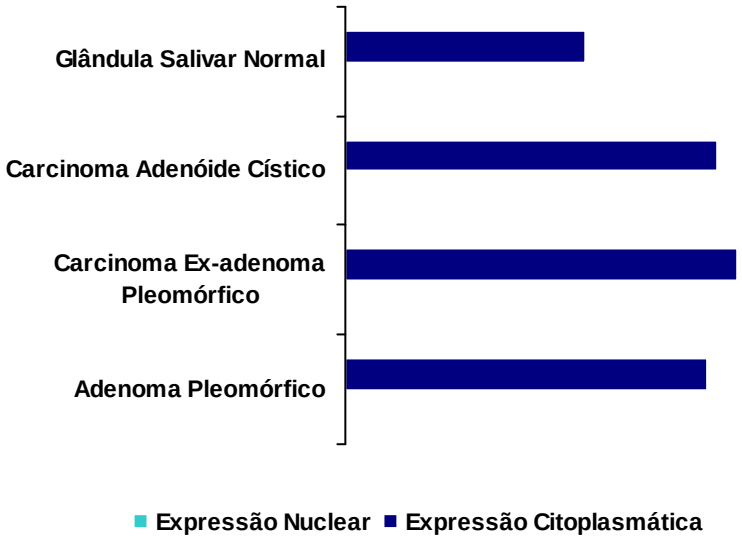

Gráfico 5.2 - Médias das expressões nucleares e citoplasmáticas da proteína NFkB

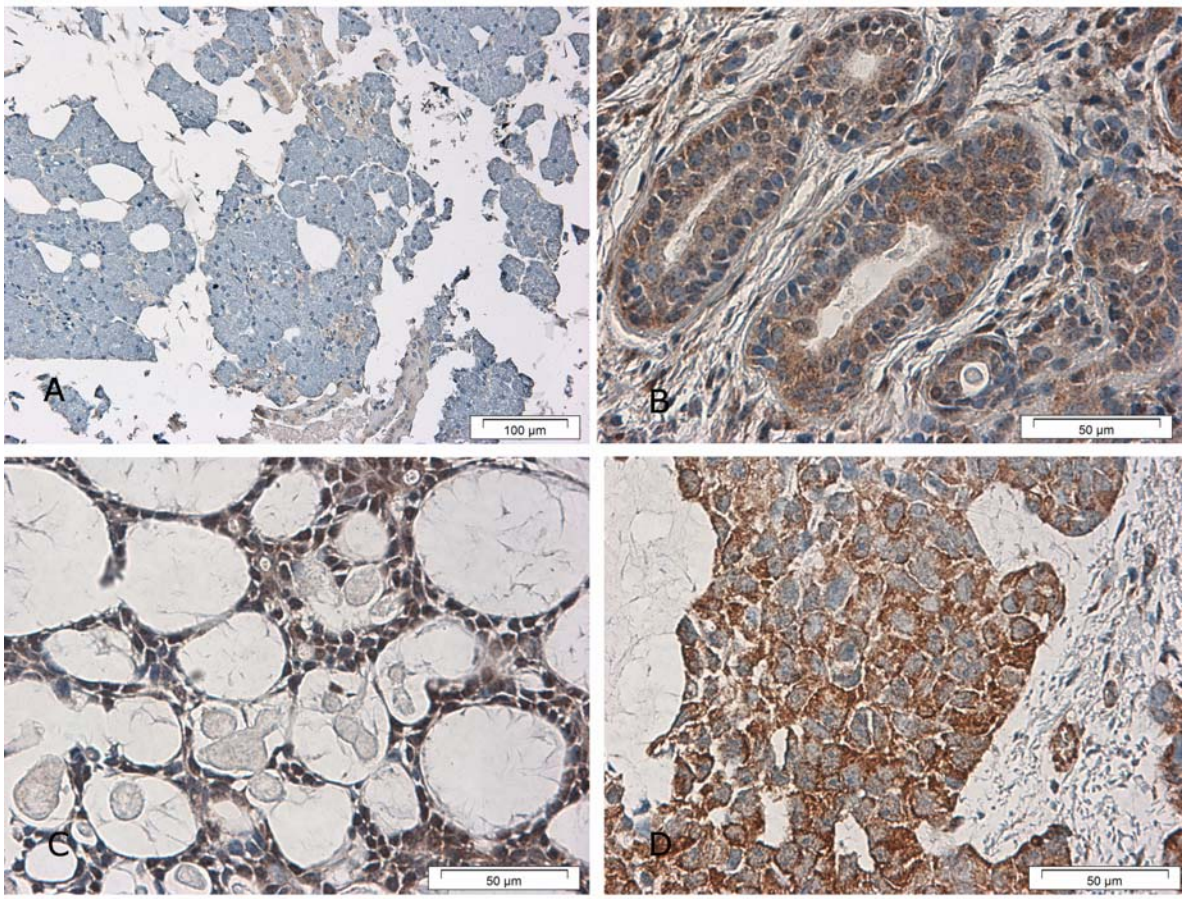

Figura 5.6 - Expressão imunoistoquímica da proteína PTEN em glândula salivar normal (A), em adenomapelomórfico(B), em carcinoma adenóide cístico (C) e em carcinoma ex-adenoma

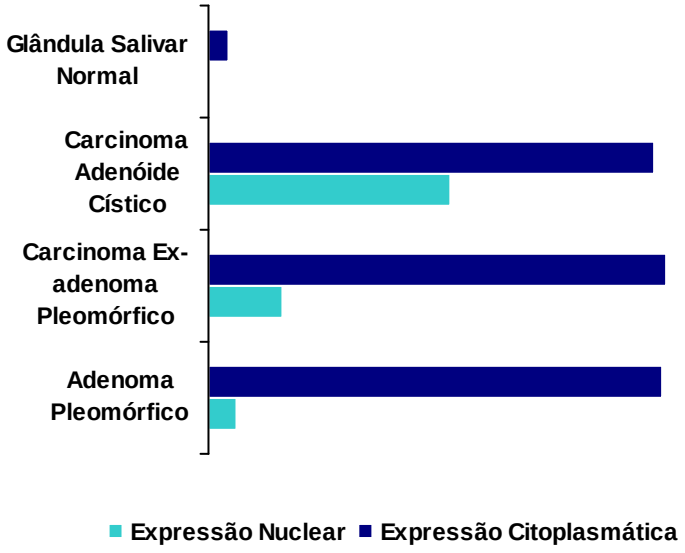

Gráfico 5.3 - Médias das expressões nucleares e citoplasmáticas da proteína PTEN

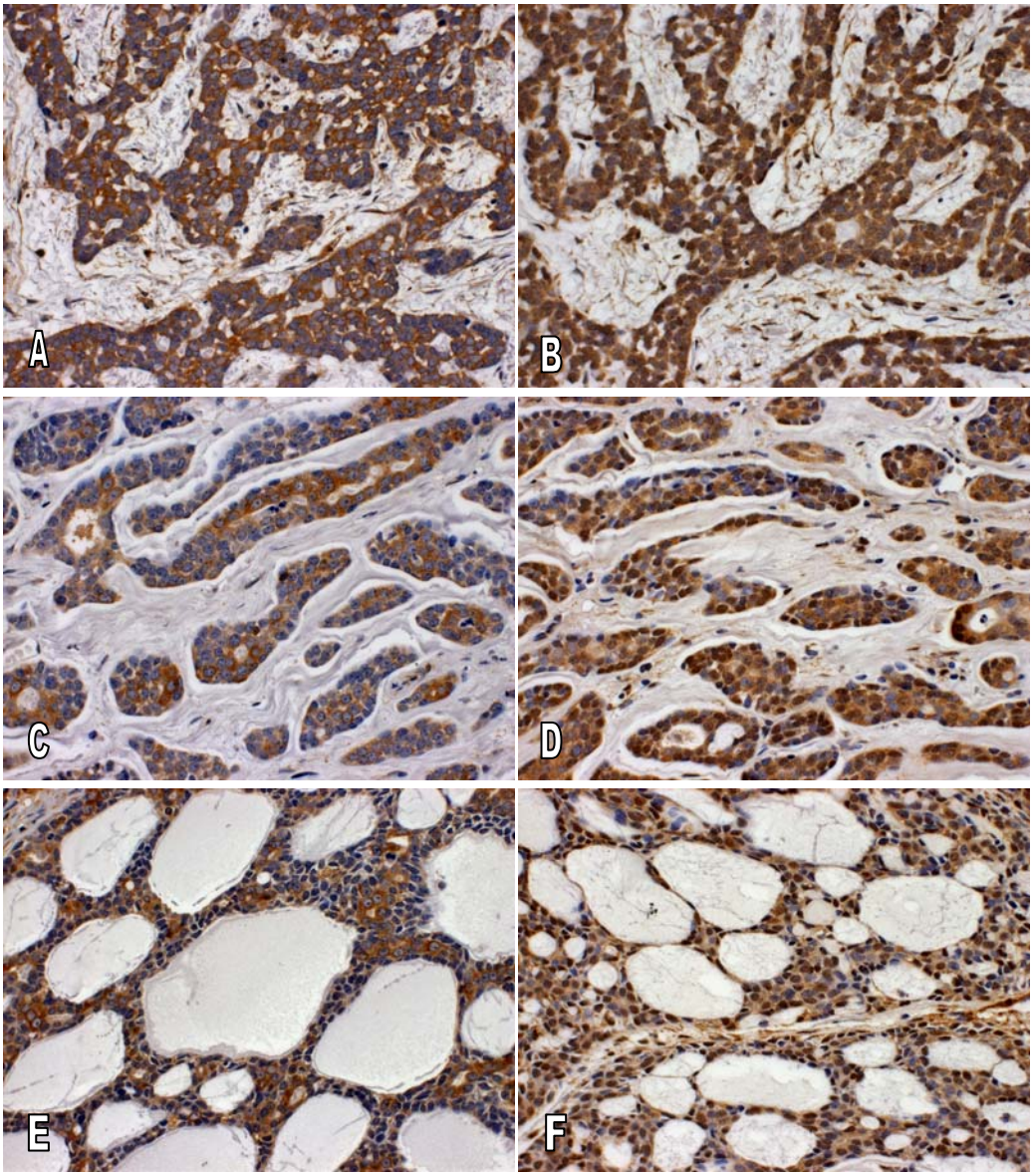

Figura 5.7 - Expressão imunoistoquímica da proteína NFkB em CAC sólido (A), tubular (C) e cribriforme (E); e expressão da proteína PTEN em CAC sólido (B), tubular (D) e no padrão cribriforme (F)

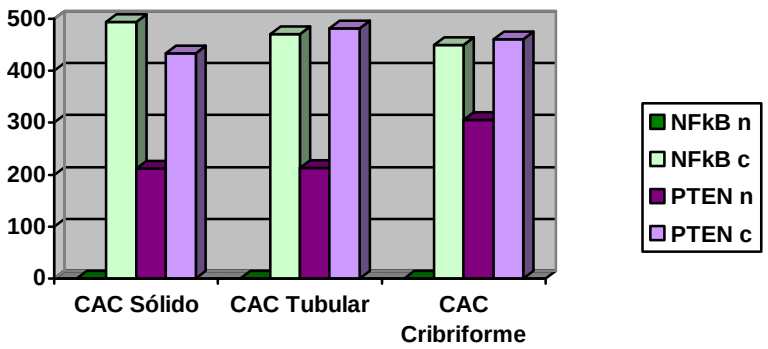

Gráfico 5.4 - Médias das expressões nucleares(n) e citoplasmáticas (c) da proteína NFkB e PTEN nos diferentes padrões histológicos dos carcinomas adenóides císticos estudados

Tabela 5.3- Resultados do teste estatístico para a expressão da proteína NFkB

	NFkB Nuclear		***p*[a]**	**NFkB** Citoplasmático		***p*[a]**
Adenoma Pleomórfico n=45	Min-Máx Média	0-21 1.4	0.452	Min-Máx Média	324-500 453	0.0008
Ex-adenoma Pleomórfico n=13	Min-Máx Média	0-13 1	0.781	Min-Máx Média	452-500 489	0.0013
Carcinoma Adenóide Cístico n=38	Min-Máx Média	0-3 0.1	0.826	Min-Máx Média	175-500 466	0.0013
Glândula Salivar Normal n=7	Min-Máx Média	0 0	-	Min-Máx Média	31-472 301	-

Valor de p obtido pelo teste *U* de Mann-Whitney

Tabela 5.4 - Resultados do teste estatístico para a expressão da proteína PTEN

	PTEN Nuclear		***p*[a]**	**PTEN** Citoplasmático		***p*[a]**
Adenoma Pleomórfico n=45	Min-Máx Média	0-193 30	0.0020	Min-Máx Média	387-500 480	0.0000
Ex-adenoma Pleomórfico n=13	Min-Máx Média	0-390 79	0.0023	Min-Máx Média	450-500 484	0.0003
Carcinoma Adenóide Cístico n=38	Min-Máx Média	5-454 255	0.0000	Min-Máx Média	152-500 472	0.0000
Glândula Salivar Normal n=7	Min-Máx Média	0 0	-	Min-Máx Média	5-38 22	-

Valor de p obtido pelo teste *U* de Mann-Whitney

6 DISCUSSÃO

Os mecanismos envolvidos na regulação da homeostasia celular compreendem uma complexa trama de interações protéicas responsáveis pelo estrito equilíbrio do ciclo celular e da indução à apoptose. A quebra desse equilíbrio pode ser causada por diversos fatores, tais como a desvios na ativação e inativação de proteínas.

A tumorigênese das neoplasias de glândulas salivares permanece obscura devido à grande variedade de comportamento e de padrões histológicos destas lesões. O conhecimento dos mecanismos torna-se fundamental para seleção de modalidades terapêuticas eficazes e direcionadas aos agentes promotores do desequilíbrio do ciclo de morte e vida da célula, e ainda no desenvolvimento de marcadores que sejam capazes de detectar o estágio precoce de lesões agressivas e auxiliar no diagnóstico diferencial entre estas.

Apesar de inúmeros estudos demonstrarem a presença da mutação do gene P53 como causa principal desse desequilíbrio em diversos cânceres humanos, estudos anteriores, em nosso laboratório demonstraram a ausência de mutação no gene P53 em neoplasias de glândulas salivares, além da expressão imunohistoquímica para a proteína Mdm2 (Araújo et al., 2000).

De acordo com o acima exposto, estes estudos sugeriram que a tumorigênese das neoplasias de glândulas salivares pode acontecer de forma independe da mutação do gene P53, podendo este mecanismo ser decorrente do aumento da expressão e ativação de reguladores negativos, e também pela perda de função de fatores capazes de promover direta ou indiretamente a ativação da proteína p53 ou de seus efetores, como observado em outras neoplasias (Tachibana et al., 2004).

Somados a estes resultados, Mantesso et al. (2004), observaram a superexpressão do RNAm do Mdm2, enquanto Lima et al. (2009) e Marques et al. (2008), demonstraram a superexpressão nuclear das proteínas Mdm2 e Akt em carcinoma adenóide cístico, adenoma pleomórfico e mioepitelioma.

Neste contexto, buscamos analisar a via do Akt através da avaliação da expressão das proteínas NFkB e PTEN em neoplasias de glândulas salivares, e a interação entre as proteína Mdm2/Akt e PTEN/Akt em carcinoma adenóide cístico.

Os resultados obtidos na imuno-histoquímica revelaram que a proteína NFkB apresentou valores de expressão nuclear significantes ($p<0.05$), porém apresentou uma média de marcação muito baixa, a qual, segundo a classificação estabelecida neste estudo, foi considerada negativa (<10%).

Por outro lado, expressão citoplasmática para a NFkB não foi significante ($p<0.05$). No entanto, as marcações citoplasmáticas foram mais intensas nas neoplasias, quando comparadas às glândulas normais. Os carcinomas apresentaram expressões um pouco maiores (93,2% CACs e 97,8% CEAP) que as observadas nos adenoma pleomórfico (90,6%).

Quando analisados os diferentes padrões histológicos do carcinoma adenóide cístico, não foi observada diferenças relevantes na expressão da proteína NFkB.

O mesmo padrão de resultado, obtidos na imuno-histoquímica, foi observado no estudo das linhagens de CAC2 e AP4.

A quantificação das proteínas, possibilitada pela realização da técnica de western blotting, demonstrou que as linhagens, derivadas de carcinoma adenóide cístico (CAC2) e adenoma pleomórfico (AP4), exibiram valores semelhantes ($p\geq0.05$) à linhagem controle (Hacat), a qual sabidamente apresenta amplificação e superexpressão da proteína NFkB. Baseadas nessas semelhanças podemos afirmar que as linhagens CAC2 e AP4 também exibem superexpressão da proteína NFkB, porém este resultado demonstra a quantidade total de proteína intracelular, sem levar em consideração a localização nuclear ou citoplasmática das mesmas.

Para contornar esta dificuldade, realizou-se a análise por imunofluorescência para avaliar a localização intracelular da proteína NFkB. A análise demonstrou a expressão predominantemente citoplasmática, com poucas células exibindo expressão nuclear.

Combinados estes resultados de expressão da proteína NFkB (expressão apenas citoplasmática um pouco aumentada nas neoplasias estudas e negativa no núcleo) podemos supor que esta via não está sendo ativada pelo aumento da expressão de Akt observada nas neoplasias de glândula salivares em estudos anteriores (Marques et al., 2008; Lima et al., 2009), e que a maior sobrevida das células, nestas neoplasias, pode estar sendo promovida por outros caminhos, que não o da ativação de transcrição pela proteína NFkB, apesar de estudos

considerarem uma baixa expressão nuclear (12 a 4,5%) ou expressão citoplasmática relevantes para a tumorigênese de carcinoma adenóide cístico (Zhang; Peng, 2007).

Nossa interpretação de que a proteína não se encontra ativa no citoplasma advém de estudos que mostram que o NFkB é uma proteína de transcrição, logo seu papel está vinculado a sua localização nuclear (Palombella et al., 1994; Ghosh et al., 1998; Bharti; Aggarwal, 2002; Hayden; Ghosh, 2008). Além disso, são necessárias modificações pós-translacionais da proteína NFkB para possível interação com os co-ativadores de transcrição no núcleo (Hayden; Ghosh, 2008). As expressões obtidas nas glândulas normais corroboram com esta escolha de interpretação.

Em carcinoma de mama, estudos demonstraram (Biswas et al., 2004; Singh et al., 2007) a ativação da proteína NFkB confinada, predominantemente aos subtipos estrógeno-negativos. Em relação a neoplasias de glândulas salivares, estudo em andamento em nosso departamento observou a superexpressão nuclear de estrógeno beta em blocos parafinados e linhagem celular de carcinomas adenóide císticos. Estes dados recém obtidos nos levam a crer que a expressão citoplasmática da proteína NFkB, a qual consideramos inativa, observada em nosso estudo pode estar relacionada a expressão hormonal, assim como descrito acima em carcinoma de mama.

Em relação à proteína PTEN, os resultados obtidos da análise imuno-histoquímica revelaram que esta apresentou diferença estatística entre as neoplasias estudadas e as glândulas salivares normais ($p<0.05$). As expressões citoplasmáticas do PTEN foram semelhantes nas três neoplasias estudadas.

A expressão nuclear da proteína PTEN mostrou grande diferença de marcação entre as neoplasias. O adenoma pleomórfico exibiu expressão nuclear negativa (<10%) para o PTEN, enquanto o carcinoma ex adenoma pleomórfico demonstrou expressão nuclear fraca (10 a 25%). O Carcinoma adenóide cístico demonstrou um padrão de expressão nuclear completamente distinto das outras neoplasias estudadas, com média de marcação de 51%, sendo esta considerada intensa, sendo esta expressão um pouco maior nos carcinomas adenóide císticos de padrão histológico cribriforme.

Estes achados observados no carcinoma adenóide cístico são semelhantes aos observados por Zhou et al. (2000) em linhagens de melanoma, as quais exibiram expressão nuclear para a proteína PTEN e diminuição (ausência) da

expressão nuclear do PTEN nas linhagens mais agressivas (metastáticas) quando comparadas a linhagens primárias, apesar de nossos resultados terem mostrado apenas uma redução de expressão no padrão sólido, comparado ao cribriforme.

Na técnica de western blotting a expressão de PTEN nas linhagens CAC2 e AP4 foi estatisticamente semelhante à linhagem controle (Hacat), a qual superexpressa esta proteína.

Através da técnica de imunofluorescência, foi possível observar as diferentes localizações da proteína PTEN nas linhagens investigadas. A linhagem AP4 demonstrou forte expressão de localização exclusivamente citoplasmática, enquanto na linhagem de carcinoma adenóide cístico (CAC2) apresentou forte expressão nuclear do PTEN com fraca expressão citoplasmática.

Reunindo os dados obtidos da expressão da proteína PTEN, tanto nas linhagens quando nas neoplasias representadas pelos blocos parafinados, podemos observar que a proteína PTEN de localização nuclear pode estar inativa, ou atuando como reguladora do ciclo celular como observado em carcinoma de mama e adenocarcinoma endometrial (Ginn-Pease e Eng, 2003; Kimura et al, 2004) ou ainda atuando na manutenção da integridade genômica como defendem outras pesquisas (Baker 2007; Shen et al., 2007).

A literatura referente à neoplasia de mama mostra similaridade em relação aos estudos em glândula salivar, principalmente pelo fato de que algumas neoplasias de mama, assim como as de glândula salivar, são formadas por células ductais e mioepiteliais.

Em neoplasias de mama, Kappes et al. (2001) sugerem que a expressão de PTEN mostrou-se diminuída em hormônio positivos, corroborando com a opinião de Jacob et al. (2009), que sugerem que há diferente mecanismo de ação em tecidos e tumores responsivos para hormônios.

Em relação às interações protéicas, avaliadas pela técnica de co-imunoprecipitação, foi possível demonstrar a ausência de interação direta entre as proteínas p-Akt/Mdm2 e p-Akt/PTEN na linhagem de carcinoma adenóide cístico. Estes resultados mostram que, apesar na presença destas proteínas no interior do núcleo dos carcinomas adenóides císticos, estas proteínas não estão unidas diretamente, mas são capazes de interagir através da fosforilação ou defosforilação.

Estas informações são importantes para o esclarecimento da via do Akt em neoplasias de glândulas salivares, pois tem se buscado um provável alvo para o tratamento quimioterápico para o carcinoma adenóide cístico. No entanto, o desenvolvimento de resistência à terapia representa um importante problema clínico. Falha na atividade do programa de apoptose representa um importante mecanismo de resistência a drogas pelas células tumorais. Os sinais de sobrevida induzidos por vários receptores são mediados, principalmente pela proteína Akt; explicando a contribuição decisiva da via do Akt no fenótipo resistente a estas terapias. Muitas vias de sinalização envolvidas na transformação celular têm sido investigadas e pesquisas estão em curso, objetivando o desenvolvimento de estratégias de tratamento que atuem nas moléculas de sinalização especificamente ou em seus efeitos terminais. As novas drogas têm sido direcionadas à inativação da via do Akt, logo a completa elucidação desta via poderá ajudar a explorar plenamente os benefícios potenciais destas novas drogas (Vara et al., 2004; Engelman, 2009).

7 CONCLUSÕES

7.1 Não foi observada expressão relevante da proteína NFkB nas neoplasias avaliadas, quando comparadas as glândulas salivares normais.

7.2 Há superexpressão nuclear da proteína PTEN nos carcinomas analisados, predominantemente nos carcinomas adenóide císticos.

7.3 Não há interação direta entre as proteínas p-Akt/Mdm2 e p-Akt/PTEN em carcinoma adenóide cístico

REFERÊNCIAS[1]

Agrawal A, Yang J,Murphy RF, Agrawal DK. Regulation of the p14ARF-Mdm2-P53 pathway: An overview in breast cancer. Exp Mol Pathol 2006:1-8.

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

Araújo VC, Martins MT, Leite KRM, Gomes RS, Araújo NS. Immunohistochemical Mdm2 expression in minor salivary gland tumours and its realationship to P53 gene status. Oral Oncol. 2000;36(1):67-9.

Arboleda MJ, Lyon JF, Kabbinavar FF, Bray MR, Snow BE, et al. Overexpression of Akt2/Protein Kinase Bβ Leads to up-regulation ofβ1 integrin, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. Cancer Res. 2003;63:196-206.

Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SAG. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-jBand c-Myc in pancreatic cancer cells. Oncogene. 2004;23: 8571–80.

Backlund LM, Nilsson BR, Goike HM, Schmidt EE, Liu L, et al. Short postooperative survival for glioblastoma patients with a dysfunctional Rb1 pathway in combination with no wild-type PTEN. Clin Cancer Res. 2003;9(15):4151-8.

Baker SJ. PTEN Enters the Nuclear Age. Cell. 2007;12:25-8.

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

Bharti AC, Aggarwal BB: Nuclear factor-kappa B and cancer: it's role in prevention and therapy (review). Biochem Pharmaco. 2002, 64:883-8.

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

Biswas DK, Shi Q, Bailey S, et al. NF-nB activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:10137–42.

Bradley PJ. Adenoid cystic carcinoma of head and neck: a review. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2004;12:127-32.

Chang CJ, Freeman DJ, Wu H.PTEN regulates Mdm2 expression through the P1 promoter. J Biol Chem. 2004 Jul 9;279(28):29841-8.

Chen FE, Ghosh G. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factor: strutural views. Oncogene 1999;18:6845-52.

Chow LM, Baker SJ. PTEN function in normal and neoplastic growth. Cancer Lett. 2006;241(2):184-96

Coffer PJ, Jin J,Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. Biochem J 1998;335:1-13.

Dahia PL, Marsh DJ, Zheng Z, Zedenius J, Komminoth P, Frisk T et al. Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors. Cancer Res 1997; 57:4710–3.

Dardick I, Van Nostrand AW, Jean MT, Rippstein P, Edwards V. Pleomorphic adenoma, I: Ultrastructural organization of “epithelial”regions. Hum Pathol 1983;14:798-809.

Dolcet X, Llobet D, Palhares J, Matias-Guiu X. NF-kB in development and progression of human cancer. Virchows Arch. 2005;446(5):475-82.

Ellis GL, Auclair PL. Tumors of the Salivary Gland. 4a ed. Washington DC: ART Press ;2008. 524p.

Eneroth CM, Zetterberg A. Malignancy in pleomorphic adenoma. A clinical and microspectrophotometric study. Acta Otolaryngol 1974;77:426-32.

Engelman JA.. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nature Reviews,Cancer 2009;9:550-62.

Freeman DJ, Li AG, Wei G, Li HH, Kertesz N. PTEN tumor supressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and independent machanims. Cancer Cell. 2003;3:117-30.

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.

Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ, Shi X, Jiang BH. The G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2004;287(2):281-91

Garcia JM, Silva JM, Dominguez G, Gonzalez R, Navarro A, Carretero L et al. Allelic loss of the PTEN region (10q23) in breast carcinomas of poor pathophenotype. Breast Cancer Res Treat. 1999;57:237–43.

Gilmore TD. Introduction to NF-kB: players, pathways, perspectives. Oncogene. 2006;25:6680-4.

Ginn-Pease ME, Eng C. Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. Cancer Res. 2003;63:282–6.

Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. NF-_B and Rel proteins: Evolutionary conserved mediators of immune responses. Ann Rev Immunol. 1998;16: 225-8.

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

Hancock BD. Clinically benign parotid tumours: local dissection as an alternative to superficial parotidectomy in selected cases. Ann R Coll Surg Engl. 1999;81(5):299-301

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

Hayden MS, Ghosh S. Shared Principles in NF-kB Signaling. Cell. 2008;132(3):344-62.

Ito FA, Ito K, Vargas PA, Almeida OP, Lopes MA. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. Int J Oral Maxillofac Surg. 2005; 34: 533–6.

Jacob AI, Romigh T, Waite KA, Eng C. Nuclear PTEN levels and G2 progression in melanoma cells Melanoma Res. 2009;19(4):203-10.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW.NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. Nat Rev Cancer 2002;2: 301-10.

Karin M, Li A. NF-kB at the crossroads of life and death. Nat Immunol. 2002;3:221-7.

Kappes H, Goemann C, Bamberger AM, Loning T, Milde-Langosch K. PTEN expression in breast and endometrial cancer: correlations with steroid hormone receptor status. Pathobiology 2001;69:136–42.

Kimura F, Watanabe J, Hata H, Fujisawa T, Kamata Y, Nishimura Y, et al. PTEN immunohistochemical expression is suppressed in G1 endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus. J Cancer Res Clin Oncol 2004;130:161–8.

Kokemueller H, Eckardt A, Brachvogel P, Hausamen JE. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck-a 20 years experience. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2004; 33: 25–31.

Laezza C, Malfitano AM, Matola TD, Ricchi P, Bifulco M. Involvement of Akt/NF-κB pathway in N^6-isopentenyladenosine-induced apoptosis in human breast cancer cells. Mol Carcinog. 2010;29: [No prelo]

Lee SB, Xuan NTL, Choi JW, Lee KH, Cho SW, Liu Z, et al. Nuclear Akt interacts with B23/NPM and protects it from proteolytic cleavage, enhancing cell survival.. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(43):16584-9.

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

Li X,Stark GR. NFkB-dependent signaling pathways. Exp Hematol 2002;30:285-96.

Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat Genet. 1997;16:64–7.

Lima Mde D, Marques YM, Alves Sde M Jr, Freitas VM, Soares FA, de Araújo VC, Pinto Ddos S Jr, Mantesso A. MDM2, P53, P21WAF1 and pAKT protein levels in genesis and behaviour of adenoid cystic carcinoma. Cancer Epidemiol. 2009;33(2):142-6.

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

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

Marques YM, de Lima Mde D, de Melo Alves Sde M Jr, Soares FA, de Araújo VC, Pinto Ddos S Jr, Mantesso A. Mdm2, p53, p21 and pAKT protein pathways in benign neoplasms of the salivary gland. Oral Oncol. 2008;44(9):903-8.

Martelli AM, Faenza I, Billi AM, Manzoli L, Evangelisti C , Fala F, Cocco L. Intranuclear 3′-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: New mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? Cellular Sign 2006;18:1101–7.

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

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

Mayo LD, Dixon JE, Durden DL, Tonks NK, Donner BD. Pten protecs p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cell to chemotherapy. J Biol Chem. 2002;277(7):5484-9.

Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic´ M, Hemmings BA. Mitogenic Activation, Phosphorylation, and Nuclear Translocation of Protein Kinase Bb. J Biol Chem. 1997;272(48):30491–7.

Mendenhall WM, Mendenhall CM, Werning JW, Malyapa RS, Mendenhall NP. Salivary Gland Pleomorphic Adenoma. Am J Clin 2008;31: 95-9.

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

Nicholson KM and Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in humam malignancy. Cellular Sign. 2002;14:381-95.

Olsen KD, Lewis JE Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a clinicopathologic review Head and Neck 2001;23:705-12.

Oliveira FA, Duarte ECB, Taveira AT, Máximo AA, Aquino EC, Alencar RC, et al. Salivary Gland Tumor: A Review of 599 Cases in a Brazilian Population. Head and Neck Pathol 2009; 3:271–5.

Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. Apoptosis 2004; 9: 667–76.

Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiqutin-proteasome pathway is required for processing the NF-kB1 precursor protein and the activation of NF-kB. Cell. 1994;78(5):773-85.

Park SS, Kim SW. Activated Akt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with HER2 overexpression. Oncol Rep 2007;18:139-43.

Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. J Cell Sci. 2008;121(Pt 3):249-53.

Ravi R, Bedi A. NF-kappaB in cancer--a friend turned foe. Drug Resist Updat. 2004;7(1):53-67.

Renehan A, Gleave EN, McGurk M. An analysis of the treatment of 114 patients with recurrent pleomorphic adenomas of the parotid gland. Am J Surg 1996;172(6):710-4

Roijer E, Nordkvist A, Strom A, Ryd W. Behrendt M, Bullerdiek J, et al. Translocation, deletion/amoplification, and expression of HMGIC and Mdm2 in a carcinoma ex pleomorphic adenoma. Am J Pathol 2002;160(2):433-40.

Rudellius M, Pittaluga S, Nishikuka S, Pha TH, Fend F, Jaffe ES, et a. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogehesis and survival of mantle cell lymphoma. Blood. 2006;108(5):1668-78.

Scholtt T, Naget H, LaskawiR, Eiffer TH. Droese M. Generic analysis of the human oncoprotein Mdm2in benign and malignant tumors of salivary gland. Patobiol 2001;69:67-76.

Shen L, Sun CF.The expression of PTEN and PKB in salivary adenoid cystic carcinoma and its clinical significance. Shanghai Kou Qiang Yi Xue. 2005 ;14(2):159-63.

Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, Yin Y.Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. Cell. 2007;128(1):157-70.

Singh S, Shi Q, Bailey ST, Palczewski MJ, Pardee AB, Iglehart JD, et al.Nuclear factor-kappaB activation: a molecular therapeutic target for estrogen receptor-negative and epidermal growth factor receptor family receptor-positive human breast cancer.Mol Cancer Ther. 2007;6(7):1973-82.

Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumours. Oral Diseases 2002; 8:229–40.

Spiro RH: Distant metastases in adenoid cystic carcinoma of salivary origin. Am J Surg 1997, 174:495–8.

Suh et al., 2004 A proteína IKKα fosforilada (ativada) promove a proteólise parcial e liberação de p53/RelB. Os dímeros, então, movem-se para o núcleo, onde podem ativar os genes alvos (

Sun ZJ, Chen G, Hu X, Zhang W, Liu Y, Zhu LX, Zhou Q, Zhao YF. Activation of PI3K/Akt/IKK-a/NF-jB signaling pathway is required for the apoptosis-evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma: its inhibition by quercetin. Apoptosis 2010; 15:850–63

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

Tergaonkar V, Perkins ND. p53 and NF-kappaB crosstalk: IKKalpha tips the balance.Mol Cell. 2007;26(2):158-9..

Testa JR, Bellacosa A . AKT plays a central role in tumorigenesis. PNAS 2001; 98(20):10983–5.

Teng DH, Hu R, Lin H, Davis T, Iliev D, Frye C, et al. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. Cancer Res 1997;57:5221–5.

Tincani AJ, Del Negro A, Araújo PP, Akashi HK, Martins AS, Altemani AM, Barreto G. Management of salivary gland adenoid cystic carcinoma: institutional experience of a case series. Sao Paulo Med J. 2006;124(1):26-30.

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

Valentini V, Fabiani F, Perugini M, Vetrano S, Iannetti G. Surgical Tecnnicruee in tne Treatment of Pleomorphic Adenoma oftne Parotid Gland: Our Experience and Review of Literature. J Craniofac Surg. 2001;12: 565-8.

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

Völker HU, Scheich M, Berndt A, Haubitz I, Metzger A, Müller-Hermelink HK, Kämmerer U, Schmidt M. Expression of p-AKT characterizes adenoid cystic carcinomas of head and neck with a higher risk for tumor relapses. Diagn Pathol. 2009;19:4-18.

Zhang J; Peng B.In vitro angiogenesis and expression of nuclear factor κB and VEGFin high and low metastasis cell lines of salivary gland Adenoid CysticCarcinoma. BMC Cancer 2007;7:1-7.

Zhang J, Peng B. NF-B promotes iNOS and VEGF expression in salivary gland adenoid cystic carcinoma cells and enhances endothelial cell motility *in vitro.* Cell Prolif.2009,42, 150–61

Zhou XP, Gimm O, Hampel H, Niemann T, Walker MJ, Eng C. Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. Am J Pathol 2000;157:1123–8.

Zhou et al. (2003) que ao investigarem glioblastomas, através da avaliação de cDNA pelo método de PCR

Yamamoto Y,Gaynor RB.Therapeutic potential of inhibition of the NFkappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. J. Clin. Invest. 2001;107:135-142.

Yang J, Ren Y, Wang L, Li B, Chen Y, Zhao W, Xu W, Li T, Dai F. PTEN mutation spectrum in breast cancers and breast hyperplasia. J Cancer Res Clin Oncol. 2010 ;136(9):1303-11.

Yih WY, Kratochvil FJ, Stewart JC. Intraoral minor salivary gland neoplasms:review of 213 cases. J Oral Maxillofac Surg. 2005;63(6):805-10.

Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. Oncogene. 2008;27(41):5443-53.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 171/07

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"ANÁLISE DA VIA DO AKT NA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MDM2 EM NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS DE GLÂNDULA SALIVAR"**, de responsabilidade da Pesquisadora, **YONARA M. F. SOARES MARQUES,** sob orientação da Professora Doutora **SUZANA CATANHEDE ORSINI MACHADO DE SOUSA.**

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, 04 de dezembro de 2007

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-900
São Paulo – SP - Diretoria Telefax: (011) 3091- 0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7895
Impresso no S.D.O.