FERNANDA SALGUEIREDO GIUDICE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS Akt, NF- κ B & CICLINA
D1 EM LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE
DE CABEÇA E PESCOÇO EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL E
CÂMARA DE INVASÃO**

São Paulo
2009

Fernanda Salgueiredo Giudice

**Análise da expressão das proteínas Akt, NF- κ B & Ciclina D1 em
linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e
pescoço em ambiente tridimensional e câmara de invasão**

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

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Giudice FS. Análise da expressão das proteínas Akt, NF- κ B & Ciclina D1 em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em ambiente tridimensional e câmara de invasão [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo,/....../2009

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

“Á DEUS, POR TUDO”

Por me proteger, guiar e acompanhar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Sergio e Custodia, pelo exemplo de amor, dedicação, honestidade e educação. Obrigada pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões e por tornar possível todos os meus sonhos, como o de estudar na Universidade de São Paulo...Vocês sempre fizeram com que o impossível fosse possível pra mim...Com vocês aprendi que querer é poder...desistir jamais...Assim, dizer obrigada é pouco perto da felicidade que sinto de ter pais maravilhosos como vocês, que sempre foram e serão os pilares da minha vida.

Ao meu querido irmão Rafael, que sempre esteve e, tenho certeza que, sempre estará presente em minha vida...Obrigada por sua amizade, amor e apoio...Aproveito o momento para agradecer também a Ana Vitória pelas palavras de incentivo e carinho...

Aos meus avós, principalmente, minha querida vovó Maria (*in memoriam*)...Obrigada por me cuidar, enquanto meus pais precisavam trabalhar, e

por toda a educação e exemplo de vida, que para mim são os maiores tesouros que uma pessoa pode deixar...Sinto muito sua falta...

Ao meu Andrés, por ser mais do que um namorado. Obrigada por sua amizade, respeito, paciência, apoio e amor! Você sempre me incentivou em todos os momentos, sendo eles fáceis ou difíceis, comemorando cada pequena vitória deste percurso e estando presente em cada pedacinho não só deste trabalho, mas da minha vida...A você, que me ajuda diariamente a entender o amor e muitas outras coisas, o meu muito obrigada sempre e de coração...Juntos conquistaremos tudo que desejarmos...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Em primeiro lugar, ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, pela confiança em me aceitar como sua aluna de iniciação científica e depois de mestrado. Tenho um imenso orgulho de poder ser sua orientada porque para mim você é um exemplo de profissionalismo, paciência, respeito, dedicação e inteligência...A cada dia, você desperta em mim um maior interesse pela pesquisa, com suas idéias e demonstrações de verdadeira paixão por aquilo que faz...Se estou me tornando uma professora e pesquisadora devo isso a você, por me guiar e me conduzir tão bem ao encontro do saber...Obrigada pela sua disponibilidade, cumplicidade e conselhos durante esses quatro anos mas, mais do que tudo isso, obrigada pela sua amizade. Espero que eu possa continuar caminhando ao seu lado por muito tempo.

A vocês amiguinhas, Aluana Maria da Costa Dal Vechio e Aline Corrêa Abrahão:

Alu, minha grande amiga, obrigada por ter me ajudado em todos os estágios deste trabalho, desde as primeiras etapas de cultivo celular até o último Western Blotting ou elaboração do artigo...Trabalhar com você é muito prazeroso...tudo fica mais calmo e divertido...Obrigada também pela ajuda com as minhas primeiras rotinas...Você sabe a admiração e carinho que tenho por você...além de minha colega de trabalho você se tornou uma pessoa indispensável na minha vida...

Aline, minha amiga carioca...com você aprendi que toda a regra tem exceção...não é que carioca trabalha...rsrsrs...Brincadeiras a parte, obrigada por tudo...pela sua dedicação e ajuda com a técnica de Western Blot, elaboração do artigo e análise estatística deste trabalho (não deixando de lembrar do Marcelo...nosso consultor em bioestatística...rsrsrs...). Também, sou imensamente grata pelo seu grande apoio nas minhas primeiras rotinas e só tenho a desejar a você muita sorte nas próximas etapas da sua vida....

Assim meninas, mais uma vez obrigada por me ajudarem a tornar possível esta dissertação e tenho certeza que vamos desenvolver ainda muitos outros estudos juntas....Mas, uma coisa é certa, com este trabalho já colhemos e colheremos ainda muitos frutos...e um deles foi a nossa amizade! E não fiquem com saudades dos nossos encontros matinais: “7:00 no P3”...rsrsrs...o doutorado nem começou...rsrsrs...

AGRADECIMENTOS

Prof^a. Dr^a. Suzana C.O.M. Sousa, obrigada pela sua participação na banca de qualificação deste trabalho, pois sua presença foi de grande importância na elaboração inicial deste estudo. Por sua diplomacia, paciência, simplicidade, dedicação e inteligência, tornou-se um exemplo não só de pesquisadora e professora para mim, mas de uma pessoa em que sempre irei me espelhar.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães, Fábio Daumas Nunes, Marília Trierveiler Martins, Karem Lopez Ortega e Andréa Mantesso, meus sinceros agradecimentos pelos conhecimentos transmitidos, incentivos e convivência agradável.

As funcionárias da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: Zilda Alves, Néia Barbosa, Nair Pereira, Elisa Santos, Beatriz Costa e Edna Todai (*in memoriam*), pela amizade e por sempre me ajudarem a superar os diversos obstáculos do cotidiano. Elisa, muito obrigada pelo carinho, ajuda e incentivo nas minhas primeiras rotinas...

A Ana Carolina Thomé Capuano pela participação na banca de qualificação deste trabalho e por toda a ajuda desde a minha época de iniciação científica. Os conhecimentos transmitidos por você foram de extrema valia não só para a execução deste estudo, mas para a minha formação.

A Katiuchia Uzzun Sales, pela paciência e ajuda durante toda a minha iniciação científica. Agradeço por todos os ensinamentos, pela grande amizade e incentivo na minha escolha pelo caminho da pesquisa na Odontologia. Desejo a você muito sucesso e admiro cada vez mais a sua inteligência e dedicação

Ao Felipe Torquato Salles e Sergio de Melo Alves, pela ajuda durante toda a minha iniciação científica.

A Fátima Klingbeil, pela verdadeira amizade e incentivo durante esses dois anos de mestrado. Determinação, objetividade e firmeza em suas decisões e opiniões são algumas das suas qualidades mais admiráveis e que me influenciaram muito. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos não só a respeito de cultura celular, mas sobre a vida...Obrigada também por todo o apoio e paciência nas minhas primeiras rotinas. Aproveito aqui para agradecer a sua filha Natascha pela ajuda inicial com o programa Photoshop.

Aos meus queridos colegas de Pós-Graduação: Alexandra, Arthur (Tuti), Brunno, Camila Chicaro, Camila Rodini, Erika, Fabio Coracin, Felipe Fornias Sperandio, Felipe Perozzo Daltoé, Fernanda Paula Yamamoto, Flávia Caló, Flávia Pontes, Hélder, Juliana Lucena Schussel, Juliana Noguti, Karin, Katiucia, Lourdes Vanesa, Luciana Sassa, Márcia Campos, Marco Aurélio (Maga), Maria Fernanda, Marina de Deus, Mayra, Patricia Adachi, Paulo Sergio da Silva Santos, Renata Acay, Roberto, Ronald, Sérgio Cury, Tatiana Libório, Tessa, Thaís Acquafreda e Yonara.

A Dr^a. Ângela Maciel, minha sempre odontopediatra e ortodontista, agradeço imensamente todo o carinho e apoio. Seu profissionalismo, ética, dedicação e amor a profissão me influenciaram, desde os sete anos de idade, na minha decisão por estudar Odontologia. Obrigada pela amizade e por sempre vibrar com as minhas conquistas!

Aos meus verdadeiros amigos desde a difícil e ao mesmo tempo maravilhosa época de Agostiniano Mendel: Érika Kayaki, Camila Salgueiredo e Felipe Sperandio (atual colega de pós-graduação)...Obrigada pelo apoio de sempre!

Aos meus amigos de graduação: Ana Paula Bloise, Carolina Vasconcellos Teixeira, Fernanda Parras, Priscilla Saluceste. Inesquecíveis momentos que

passamos durante quatro anos e meio de FOUSP! Obrigada por tudo e principalmente pelo apoio durante a minha iniciação científica na Patologia Bucal!

*Os gênios se compõem de 2% de talento e
98% de perseverante aplicação ao trabalho
(Ludwig Van Beethoven)*

*Nenhuma grande descoberta foi feita
jamais sem um palpite ousado
(Isaac Newton)*

*A dúvida é o principio da sabedoria
(Aristóteles)*

Giudice FS. Análise da expressão das proteínas Akt, NF- κ B & Ciclina D1 em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em ambiente tridimensional e câmara de invasão [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O carcinoma epidermóide representa mais de 90% das neoplasias malignas de cabeça e pescoço, apresentando taxas elevadas de morbi-mortalidade, porém pouco se sabe sobre as vias de sinalização que estão envolvidas na progressão tumoral. Têm sido relatado na literatura, que alguns estímulos podem ativar a holoenzima PI3K que, por sua vez, desencadeia um processo que induz a fosforilação da proteína Akt (pAkt) que leva a ativação e a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo, onde ocorre a transcrição de genes envolvidos na proliferação e invasão celular. Assim, esse estudo analisou, através dos métodos de Imunofluorescência e Western Blot, a expressão das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1 em três linhagens de células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HN6, HN30 e HN31) submetidas a cultivo tridimensional e ensaio de invasão (gerando clones invasivos HN6.1, HN30.1 e HN31.1), ambos realizados com Matrigel[®]. O pAkt apresentou marcação citoplasmática e nuclear nas linhagens celulares HN6, HN30, HN6.1 e na HN30 submetida ao cultivo tridimensional, todavia, as linhagens celulares HN31, HN30.1, HN31.1 e HN6/HN31 cultivadas tridimensionalmente, apresentaram positividade predominantemente nuclear. No caso do NF- κ B, a localização foi marcadamente citoplasmática em todas as linhagens celulares cultivadas bi ou tridimensionalmente, porém, com exceção da

HN31.1, o padrão de marcação foi citoplasmático e nuclear nos clones invasivos. Por fim, a Ciclina D1 exibiu imunopositividade apenas nuclear. A técnica de Western Blot mostrou diminuição nos níveis de expressão das proteínas analisadas quando as células foram cultivadas em Matrigel[®], sendo, na maioria das vezes, essa redução estatisticamente significativa, exceto no caso da linhagem celular HN6, que apresentou um aumento significativo de Ciclina D1. Os clones invasivos HN6.1 e HN30.1 exibiram elevação significativa dos níveis de expressão de pAkt e NF-κB porém, a HN31.1 apresentou aumento de pAkt e discreta diminuição de NF-κB, mas ambos os valores não estatisticamente significantes. Em relação à Ciclina D1, houve um aumento dos seus níveis em todas as linhagens invasivas, sendo que apenas na HN6.1 foi estatisticamente significativa. Esses resultados mostraram que, nas linhagens celulares avaliadas, quando cultivadas em ambiente tridimensional, a significativa redução dos níveis de expressão de proteínas da via de sinalização PI3K ocorreu devido a uma possível fase adaptativa dessas células ao Matrigel[®] que seria seguida provavelmente por uma etapa de aumento do potencial proliferativo e posterior transdiferenciação de algumas células para ganho de fenótipo mais agressivo. Além disso, este estudo mostrou a participação da via de sinalização Akt/NF-κB/Ciclina D1 no processo de invasão das células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HN6.1 e HN30.1).

Palavras-Chave: carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, matriz extracelular, via de sinalização PI3K, modelo de cultivo tridimensional e câmara de invasão

Giudice FS. Expression of Akt, NF- κ B and Cyclin D1 proteins in head and neck squamous cell carcinoma cell lines submitted to three-dimensional culture model and an *in vitro* invasion assay [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma represents more than 90% of the head and neck malignant tumors, with high mortality rates. Nevertheless, the knowledge about signaling pathways involved in tumor progression remains unclear. The relationship between pAkt and NF- κ B is well established in carcinogenesis. It is known that the activation of PI3K can be induced by some factors what leads to Akt phosphorylation (pAkt). This further event starts an activation cascade that induces NF- κ B translocation from the cytoplasm into the nucleus where the transcription of genes enrolled in cellular proliferation and invasion will be done. Therefore, this study analyzed the status of pAkt, NF- κ B and Cyclin D1 proteins by Immunofluorescence and Western Blot methods in three head and neck squamous cell carcinoma cell lines (HN6, HN30 and HN31) submitted to three-dimensional culture model and an *in vitro* invasion assay (invasive clones HN6.1, HN30.1 e HN31.1), both with Matrigel[®]. pAkt expression was detected in cytoplasm and nucleus in HN6, HN30, HN6.1 and HN30 cultured with Matrigel[®], however, HN31, HN30.1, HN31.1 cell lines and HN6/HN31 submitted to three-dimensional culture model showed nuclear expression. NF- κ B localization was strongly cytoplasmatic in all cell lines cultured with or without Matrigel[®], but, regarding HN31.1, NF- κ B protein expression was nuclear and cytoplasmatic in the invasive clones. Cyclin D1 was nuclear in all cell lines analyzed. Western blot assays

showed a decrease in pAkt, NF- κ B and Cyclin D1 expression levels in all cells lines in three-dimensional culture model, most of them statistically significant, but It was detected a considerable increase in Cyclin D1 expression in HN6 cultured in three-dimensional model. Moreover, HN6.1 and HN30.1 showed a significant enhance in pAkt and NF- κ B levels but, HN31.1 demonstrated a raise in pAkt and a slight decline in NF- κ B, both were not statistically significant. Finally, an increase in Cyclin D1 expression levels was illustrated in all cell lines but, only HN6.1 showed a statistic signal. These results suggest that, in the cell lines studied, when cultured in three-dimensional model, a noteworthy reduction in expression levels of PI3K signaling pathway proteins happened for the reason that a possibly adaptation phase of these cells to Matrigel[®] was occurring, in the first moment, but it would be probably followed by an increase proliferative potential stage and subsequent transdifferentiation of some cells that could show, consequently, a more aggressive phenotype. At last, this study revealed the participation of Akt/NF- κ B/Cyclin D1 signaling pathway in invasion process of head and neck squamous cell carcinoma (HN6.1 and HN30.1).

Keywords: head and neck squamous cell carcinoma, extracellular matrix, PI3K pathway, 3D cell culture model, invasion chamber

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1- Representação esquemática da iniciação tumoral a partir de células diferenciadas.....	37
Figura 2.2- Características adquiridas pelas células neoplásicas.....	38
Figura 2.3- Representação ilustrativa do impacto das células-tronco neoplásicas no crescimento tumoral e resposta a terapia.....	40
Figura 2.4- Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt.....	50
Figura 2.5- Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt/NF-κB.....	54
Figura 2.6- Esquema ilustrativo das fases do ciclo celular de mamíferos.....	57
Figura 4.1- Esquema do modelo de cultura tridimensional.....	65
Figura 4.2- Representação da câmara bipartida.....	66
Figura 5.1- Localização da proteína pAkt nas linhagens celulares HN6, HN30 e HN31, nos grupos: controle (cultivo bidimensional), cultivo tridimensional e clones invasivos (ensaio de invasão).....	77
Figura 5.2- Localização da proteína NF-κB nas linhagens celulares HN6, HN30 e HN31, nos grupos: controle (cultivo bidimensional), cultivo tridimensional e clones invasivos (ensaio de invasão).....	78
Figura 5.3- Localização da proteína Ciclina D1 nas linhagens celulares HN6, HN30 e HN31, nos grupos: controle (cultivo bidimensional), cultivo tridimensional e clones invasivos (ensaio de invasão).....	79
Figura 5.4- (A) Bandas das proteínas pAkt, NF-κB e Ciclina D1 obtidas a partir da técnica de Western Blot - células submetidas a cultivo tridimensional (B)	

Representação gráfica da média de valores da quantificação das bandas protéicas.....	83
Figura 5.5- (A) Bandas das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1 obtidas a partir da técnica de Western Blot - células submetidas a ensaio de invasão (B) Representação gráfica da média de valores da quantificação das bandas protéicas.....	83
Figura 6.1– Esquema do Cross-talk entre a via de sinalização da STAT3 e a proteína NF- κ B.....	89
Figura 6.2- Esquema da ativação de vias de sinalização pela estimulação do receptor de EGF. Além da PI3K/Akt, há também as vias: Ras/MAPK/ERK e STAT3.....	93
Figura 6.3- Influência do inibidor TGF- β na progressão do ciclo celular.....	94
Figura 6.4- Representação esquemática do mecanismo de sinalização proposto que promove a reversão da TEM através da inibição da proteína Akt em células de CEB.....	100
Figura 6.5- Representação esquemática das vias de sinalização associadas com a TEM no câncer.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Estimativa para o ano 2008, válida também para o ano de 2009, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária, no Brasil.....	32
Tabela 2.2- Estimativa para o ano 2008, válida também para o ano de 2009, de número de casos novos de câncer, por Estado brasileiro.....	33
Tabela 4.1- Origem das linhagens celulares de CECp e sua classificação segundo o critério TNM. O número sobrescrito indica par de linhagens celulares oriundas do mesmo paciente.....	62
Tabela 4.2- Especificações técnicas dos anticorpos utilizados no ensaio de Imunofluorescência.....	68
Tabela 4.3- Especificações técnicas dos anticorpos utilizados no ensaio de Western Blot.....	72
Tabela 5.1- Análise estatística dos valores da quantificação das bandas das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1, em ambos os modelos de cultivo celular, obtidas a partir da técnica de Western Blot.....	81
Tabela 5.2- Análise estatística dos valores da quantificação das bandas das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1, controle e tratadas (.1), obtidas a partir da técnica de Western Blot.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrometro
Akt	Sinônimo de PKB – proteína quinase B
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAK	<i>Cdk activating kinase</i>
CdKs	Quinases Dependentes de Ciclina
CEB	Carcinoma Epidermóide de Boca
CECP	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
Ckis	<i>Cyclin dependet kinase inhibitors</i>
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Di-metil Sulfóxido
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
GSK3	Quinase de Síntese de Glicogênio
HN6	Linhagem celular de Carcinoma Epidermóide de base de língua
HN30	Linhagem celular de Carcinoma Epidermóide de faringe
HN31	Linhagem celular metastática de Carcinoma Epidermóide de faringe
IL-1	Interleucina
ILK	Quinase ligada a Integrina
INCA	Instituto Nacional do Câncer

I κ B	Inibidor de kappa B
mA	miliAmpere
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MB	Membrana Basal
MEC	Matriz Extracelular
mM	milimolar
mTOR	<i>Mammalian Target Rapamycin</i>
nm	nanometro
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução tampão fosfato-salina, sem cálcio e magnésio, pH 7.2
PDK-1	Fosfatidilinositol kinase-dependente 1
PDK-2	Fosfatidilinositol kinase-dependente 2
pH	Cologarítimo de concentração hidrogeniônica de uma solução (potencial hidrogeniônico)
PI3K	Fosfotidilinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PTEN	Fosfatase homóloga a tenasina
Rb	Retinoblastoma
RH	<i>Rel Homology</i>
rpm	Rotações Por Minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Ser	Serina
SFB	Soro Fetal Bovino

SHIP	<i>SH2-containing inositol phosphatase</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator Transcription</i>
TAD	<i>Transcriptional Activation Domains</i>
TEM	Transição Epitélio-Mesenquimal
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
Thr	Treonina
TNF α	Fator de Necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1 Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.....	29
2.1.1 epidemiologia.....	30
2.1.1.1 incidência.....	30
2.1.1.2 faixa etária.....	33
2.1.1.3 fatores etiológicos.....	34
2.1.2 tratamento.....	35
2.2 Carcinogênese.....	35
2.2.1 iniciação tumoral a partir de células diferenciadas.....	36
2.2.2 iniciação tumoral a partir de células-tronco.....	39
2.3 Invasão e Metástase.....	41
2.4 Matriz Extracelular.....	44
2.4.1 modelo tridimensional e Matrigel®.....	45
2.5 Via PI3K/Akt.....	46
2.6 NF-κB.....	51
2.7 Ciclina D1.....	55
2.7.1 ciclinas: panorama geral.....	56
2.7.2 ciclina D1.....	58
3 PROPOSIÇÃO.....	60
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
4.1 Cultivo Celular.....	62
4.2 Ensaio de Cultivo Tridimensional para posterior realização da técnica de Imunofluorescência.....	64

4.3 Ensaio de Invasão Celular.....	65
4.4 Técnica de Imunofluorescência.....	67
4.5 Técnica de Western Blot.....	68
4.5.1 extração protéica de células cultivadas em ambiente tridimensional.....	68
4.5.2 extração protéica de células cultivadas em ambiente bidimensional e dos clones invasivos.....	69
4.5.3 quantificação protéica.....	70
4.5.4 western blotting propriamente dito.....	71
4.5.5 análise western blotting.....	72
5 RESULTADOS.....	74
5.1 Imunofluorescência.....	74
5.1.1 modelo de cultivo tridimensional.....	74
5.1.2 ensaio de invasão celular.....	75
5.2 Western Blotting.....	80
5.2.1 modelo de cultivo tridimensional.....	80
5.2.2 ensaio de invasão celular.....	81
6 DISCUSSÃO.....	84
6.1 Modelo de Cultura Tridimensional: Influência na expressão das proteínas da via de sinalização PI3K.....	86
6.2 Ensaio de invasão celular.....	95
7 CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS.....	105
ANEXO.....	120

1 INTRODUÇÃO

Com aproximadamente 500.000 novos casos/ano, o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) representa mais de 90% de todas as neoplasias malignas dessa região e é a sexta dentre todas as várias malignidades que afetam o ser humano. Apesar dos muitos avanços em relação à prevenção e tratamento de outros tipos de câncer, em média, metade dos pacientes diagnósticos com CECP morre em cinco anos, sendo o tempo de sobrevida bem menor que o de outras neoplasias como mama, cólon, reto, cérvix. Os sobreviventes são marcados por disfunções estéticas e funcionais o que acarreta diretamente em queda da qualidade de vida.

As altas taxas de morbi-mortalidade dos pacientes com CECP estão, na maioria das vezes, relacionadas com o diagnóstico tardio e ausência de marcadores para detecção em estágios mais precoces da doença, além da resistência ao tratamento quimioterápico. Esse pobre prognóstico também reflete o fato de que apesar da sua patogênese ser claramente multifatorial, envolvendo fatores extrínsecos, como fumo, ingestão crônica de bebidas alcoólicas e radiação solar, acredita-se, atualmente, que o desenvolvimento do CECP é um processo de várias etapas, no qual inúmeros fatores externos e alterações genéticas possam estar envolvidos.

A carcinogênese é entendida como o resultado de um acúmulo de alterações gênicas que se processam ao longo das múltiplas gerações de um clone celular e geram progressivamente características fenotípicas particulares, culminando na manifestação completa do fenótipo neoplásico. Hoje em dia, acredita-se que as

células que iniciam esse processo sejam células com características semelhantes a células-tronco.

Durante o desenvolvimento do câncer, as células neoplásicas adquirem inúmeras características fenotípicas que as levam à rápida e ilimitada proliferação, invasão dos tecidos vizinhos e metástases. Atualmente, tem sido amplamente discutido o papel sinalizador da estrutura da matriz extracelular (MEC) nesse processo.

Baseando-se nisso, proteínas relacionadas à invasão, motilidade, proliferação, controle da apoptose e metástase celular estão em evidência devido ao seu envolvimento na carcinogênese. Dentre essas proteínas, importante citar as que pertencem à via de transdução de sinal PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase), como por exemplo, Akt, fator nuclear kappa B (NF- κ B) e Ciclina D1.

Ultimamente, a via de sinalização PI3K tem sido apontada como uma das mais comumente afetadas nos cânceres, provavelmente, devido ao fato de que mutações em um ou mais de seus componentes ocorram em aproximadamente 30% dos casos. Aberrações genéticas de várias proteínas que compõem essa via resultam na desregulação do crescimento, proliferação e sobrevivência celular o que contribui para desenvolvimento, invasão e metástase tumoral, além da resistência a terapias.

A proteína PI3K, depois de iniciada por diferentes moléculas como, por exemplo, fatores de crescimento, desencadeia um processo que leva fosforilação de outra proteína importante na carcinogênese, Akt, considerada como a reguladora crucial de vários processos celulares vitais, como apoptose, proliferação, diferenciação e metabolismo. Após fosforilada, a Akt leva a ativação de outras proteínas como, NF- κ B, que é translocado do citoplasma para o núcleo onde

promove a transcrição de genes como da Ciclina D1, relacionado com a proliferação celular.

Dessa forma, este trabalho objetivou verificar a participação da via de sinalização Akt/NF- κ B/Ciclina D1 no processo de invasão de células de CECP e também avaliar a influência da MEC na expressão dessas proteínas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A presente revisão destina-se a abordar de forma direta e concisa os tópicos relacionados ao assunto abordado neste estudo. Seu maior objetivo é proporcionar uma visão geral e facilitar a compreensão do vasto campo a ser analisado. Divide-se em tópicos que visam organizar e, de certa forma, encadear os diversos aspectos tratados. São eles:

2.1 Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

2.2 Carcinogênese

2.3 Invasão e Metástase

2.4 Matriz Extracelular

2.5 Via PI3K/Akt

2.6 NF- κ B

2.7 Ciclina D1

2.1 Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

“Câncer de cabeça e pescoço”, é um termo coletivo definido com base na localização anatômica para descrever neoplasias malignas apenas do trato aerodigestivo superior. Essa região anatômica inclui boca, faringe e laringe (DÖBROSSY, 2005).

Aproximadamente, 40% dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na boca, 25% na laringe, 15% na faringe, seguidos por outros sítios de menor acometimento como, por exemplo, tireóide. Mais de 90% desses tumores são carcinomas epidermóides (DÖBROSSY, 2005).

2.1.1 epidemiologia

2.1.1.1 incidência

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o número de novos casos de câncer por ano no mundo tende a aumentar de 12 milhões (2007) para 16 milhões, até 2020, sendo que dois terços deles ocorrerão nas nações em desenvolvimento.

A maior ou menor incidência de um tumor em um determinado sítio ou subsítio anatômico está diretamente relacionada à localização geográfica analisada, ou seja, pode variar de um estado/país para outro. Segundo Jemal et al. (2008), os fatores que contribuem para essa variação incluem: diferença na prevalência dos fatores de risco, acesso e utilização de serviços para diagnóstico precoce, e correta reportagem do número de casos.

O carcinoma epidermóide representa mais de 90% das neoplasias de cabeça e pescoço, surgindo cerca de 500.000 novos casos por ano no mundo. Além disso, apenas 34% deles são diagnosticados a tempo de proporcionar alguma terapia ou

cura para o paciente (FRANCESCHI et al., 2000; BSOUL; HUBER; TEREZHALMY, 2005; CHEN et al., 2006).

A literatura sugere que no caso do CECP a progressão, assim como o seu prognóstico, pode apresentar diferenças entre pacientes de países desenvolvidos e em desenvolvimento (CARVALHO et al., 2004; CONWAY et al., 2008). Todavia, esses mesmos autores acreditam que, o estabelecimento de programas educativos de prevenção e medidas para facilitar o diagnóstico precoce podem ser as escolhas mais adequadas para melhorar como um todo o tratamento e prognóstico dos pacientes com CECP de países em desenvolvimento.

Anualmente, são diagnosticados próximo de 350.000 novos casos de carcinoma epidermóide de boca (CEB) em todo o mundo (STURGIS; WEI; SPITZ, 2004) e em média metade destes pacientes morre em cinco anos, sendo o tempo de sobrevida bem menor do que o de outras neoplasias como as de mama, cólon, reto, rim e pele/melanoma (TODD; DONOFF; WONG, 1997). Os sobreviventes são marcados por disfunções estéticas e funcionais o que acarreta diretamente em queda da qualidade de vida (SIDRANSKY, 1995).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), apontam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer por ano, sendo que desse total, 231.860 casos acometerão o sexo masculino e 234.870 o sexo feminino. Além disso, são previstos 14.160 novos casos somente na boca, afetando aproximadamente três vezes mais homens que mulheres (Tabela 2.1).

Tabela 2.1- Estimativa para o ano 2008, válida também para o ano de 2009, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária, no Brasil (INCA, 2008)

Localização Primária	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Neoplasia Maligna			
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	-	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	231.860	234.870	466.730

Segundo o INCA, aproximadamente um terço desses novos casos deverão acontecer no Estado de São Paulo (4.510 acometimentos), no ano de 2008 e também no ano de 2009 (Tabela 2.2).

Tabela 2.2- Estimativa para o ano 2008, válida também para o ano de 2009, de número de casos novos de câncer, por Estado brasileiro (INCA, 2008)

Estados	Leucemias	Cavidade Oral	Pele Melanoma	Outras Localizações	Subtotal	Pele não melanoma	Todas as Neoplasias
Acre	20	20	20	80	420	280	700
Alagoas	110	110	20	890	2.530	990	3.520
Amapá	30	20	20	170	580	160	740
Amazonas	120	70	20	1.370	3.440	910	4.350
Bahia	410	760	100	3.580	12.990	5.460	18.450
Ceará	360	450	110	2.530	10.410	5.760	16.170
Distrito Federal	120	150	60	1.990	4.690	930	5.620
Espírito Santo	190	330	110	2.170	6.740	2.070	8.810
Goiás	270	330	100	2.500	8.100	3.510	11.610
Maranhão	180	70	20	1.300	3.660	1.170	4.830
Mato Grosso	130	120	40	1.360	3.800	1.470	5.270
Mato Grosso do Sul	130	150	50	1.410	4.430	1.580	6.010
Minas Gerais	960	1.140	390	14.810	35.920	8.500	44.420
Pará	240	200	30	1.470	5.230	1.850	7.080
Paraíba	150	190	30	800	3.120	1.940	5.060
Paraná	630	1.020	570	9.200	25.950	7.140	33.090
Pernambuco	350	510	100	3.520	12.250	5.790	18.040
Piauí	100	90	20	370	2.290	1.810	4.100
Rio de Janeiro	960	2.030	480	13.890	43.550	11.300	54.850
Rio Grande do Norte	170	190	30	570	3.200	2.390	5.590
Rio Grande do Sul	810	1.050	870	15.020	38.830	9.100	47.930
Rondônia	50	40	20	580	1.550	730	2.280
Roraima	20	20	20	180	460	50	510
Santa Catarina	380	430	510	3.050	11.860	6.700	18.560
São Paulo	2.530	4.510	2.140	33.740	101.840	32.140	133.980
Sergipe	70	130	20	630	2.270	930	3.200
Tocantins	50	30	20	700	1.610	350	1.960
Brasil	9.540	14.160	5.920	117.880	351.720	115.010	466.730

2.1.1.2 faixa etária

A incidência de CECP aumenta com a idade (DOBROSSY, 2005). Sabe-se que a maioria dos pacientes acometidos por essa neoplasia possui mais de 45 anos. No entanto, nas últimas décadas, muitos estudos têm apontado um aumento do número de casos em pessoas com menos de 40 anos de idade (CURADO;

HASHIBE, 2009). Na maioria das vezes, esses pacientes não foram submetidos a reconhecidos fatores de risco como, álcool e/ou tabaco, ou o tempo de exposição a esses fatores foi muito curto para provocar uma transformação maligna. A causa mais provável sugerida, atualmente, é a predisposição genética desses pacientes associada a outros agentes como imunodeficiência, infecções virais e risco ocupacional, todavia, mais trabalhos necessitam ser realizados devido à escassez de informação na literatura (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001).

2.1.1.3 fatores etiológicos

Com relação aos agentes etiológicos, o hábito de fumar ou ingerir bebida alcoólica são os principais fatores relacionados ao aparecimento de CECP. Todavia, o risco de ocorrência deste carcinoma aumenta significativamente quando o uso do tabaco é associado ao etilismo (CASIGLIA; WOO, 2001). Entretanto, já que apenas uma parcela do grupo de pessoas com esses vícios desenvolve esse tipo de neoplasia, existem dados que sugerem outros fatores como, por exemplo, hereditariedade, medicamentos, agentes infecciosos e má alimentação associada ao consumo excessivo de gordura animal, terem importância no seu aparecimento, assim, mostrando ser uma doença multifatorial (PONDER, 2001; MILLER; JOHNSTONE, 2001; DOBROSSY, 2005; INCA, 2009).

Vale ressaltar que os fatores etiológicos para os CEB e a aparência clínica das lesões pré-malignas são dados prognósticos pobres para avaliar o risco em

desenvolver o câncer. Portanto, marcadores moleculares, que possam ser usados para a avaliação do risco de desenvolvimento desta neoplasia, são necessários (PEDRERO et al., 2005).

2.1.2 tratamento

O tratamento do CECp resume-se na utilização isolada ou associada de três procedimentos: a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Em muitos casos há a necessidade de se combinar essas três modalidades. O protocolo de tratamento depende, em linhas gerais, do estágio em que se encontra a neoplasia no momento do diagnóstico (INCA, 2009).

2.2 Carcinogênese

A palavra carcinogênese é derivada do grego, na qual *karkinos* significa câncer e *genesis* produção ou origem.

Podem ser citados dois mecanismos moleculares para o câncer:

2.2.1 iniciação tumoral a partir de células diferenciadas

O câncer é considerado um crescimento incontrolável do tecido em um paciente suscetível. Apesar da comprovada influência de fatores extrínsecos, fumo e álcool, por exemplo, como já citado, na patogênese do CECp, esta é uma doença também com múltiplas alterações gênicas. Dessa forma, o caráter genético dessa neoplasia é algo bem estabelecido. (PONDER, 2001).

A exposição celular a carcinógenos desencadeia uma série de mutações genéticas consecutivas, principalmente, em pacientes com predisposição genética, ou seja, que apresentam disfunções em seus genes de reparo. Assim, há a ativação de protooncogenes e a inativação de genes supressores tumorais, levando a produção de células mutadas e com potencial neoplásico (COTRAN et al., 1994; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Portanto, o câncer é resultado do acúmulo dessas mutações, as quais são transmitidas às gerações celulares subseqüentes, até o momento em que uma célula mutada torna-se funcionalmente independente do meio ao seu redor (Figura 2.1), ou seja, apresenta alterações fenotípicas e proliferativas que a caracteriza como sendo uma célula maligna (TODD; DONOFF; WONG, 1997).

Figura 2.1- Representação esquemática da iniciação tumoral a partir de células diferenciadas (http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2001/Imuno01_desord_linfo.htm)

Em continuidade a esse evento, ocorre a expansão clonal caracterizada pela proliferação dessas células mutadas. Durante essa etapa acontecem inúmeras outras mutações devido à desregulação dos mecanismos de proliferação e diferenciação celulares. Essas mutações adicionais são responsáveis pela heterogeneidade e progressão tumoral. Dessa forma, a massa neoplásica torna-se heterogênea e individual (COTRAN et al., 1994; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Em consequência, essas células neoplásicas adquirem características aberrantes (Figura 2.2) como, por exemplo, intenso potencial de proliferação, invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Figura 2.2- Características adquiridas pelas células neoplásicas: Evasão a apoptose, angiogênese sustentada, ilimitado potencial de replicação, invasão e metástase tecidual, insensibilidade a sinais antiproliferativo e crescimento auto-suficiente (Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2000)

Estima-se que para o CEB, as células sofram de 6-10 mutações antes de tornarem-se malignas, podendo ser necessários anos de exposição aos carcinógenos para ocorrer uma combinação de mutações apropriada que culminará na transformação maligna. Desta forma, a evolução de uma célula normal para uma célula maligna define um período de tempo caracterizado como estágio pré-maligno, uma fase precoce do processo de carcinogênese, em que pode ter ocorrido qualquer mudança fenotípica decorrente das alterações moleculares (WRIGHT, 1998).

Neste sentido, há trabalhos sendo desenvolvidos buscando identificar as alterações moleculares que ditam o desenvolvimento do câncer, independentes do reconhecimento de alterações morfológicas (CRUZ et al., 1998).

2.2.2 iniciação tumoral a partir de células-tronco

Muitos autores acreditam que as células normais diferenciadas não sobrevivem tempo suficiente para acumular as mudanças genéticas necessárias para o desenvolvimento tumoral (BRAAKHUIS; LEEMANS; BRAKENHOFF, 2004). Dessa forma, mutações capazes de gerar uma neoplasia maligna ocorreriam em células específicas. Estas células seriam aquelas com características semelhantes às células-tronco (REYA et al., 2001). As células mutadas (células-tronco neoplásicas) dariam origem a dois tipos de células-filhas:

- ✓ Idênticas = imortalizadas, indiferenciadas;
- ✓ Não-Idênticas = não-imortalizadas e com grande potencial proliferativo para que ocorra a expansão clonal e progressão tumoral.

Essas células-tronco neoplásicas idênticas permaneceriam em um estado predominantemente quiescente na massa tumoral, porém teriam um importante papel na heterogeneidade do tumor e na sua recorrência após o tratamento, pois se acredita que possam apresentar a característica de quimioresistência (Figura 2.3).

Assim, novas terapias precisam ser desenvolvidas tendo como alvo células-tronco neoplásicas (REYA et al., 2001; LI; XIE, 2005; HOUGHTON et al., 2007).

Célula tronco-neoplásica:

- quiescente
- quimioresistente

Figura 2.3- Representação ilustrativa do impacto das células-tronco neoplásicas no crescimento tumoral e resposta a terapia. (A) Formação do tumor a partir de uma célula específica, ou seja, célula-tronco. (B) Possível efeito da terapia convencional antineoplásica versus terapia cujo principal alvo são as células-tronco neoplásicas (Adaptado de HOUGHTON et al., 2007)

Sub-populações de células tumorais com características de células-tronco foram identificadas em neoplasias de mama, próstata, melanoma, entre outras (AL-HAJJ et al., 2003; FANG et al., 2005; COLLINS et al., 2005).

2.3 Invasão e Metástase

Metástase deriva do grego *metástatis* que significa mudança de lugar, transferência. Por definição, a metástase constitui um crescimento neoplásico à distância, sem continuidade e sem dependência do foco primário. Essa mudança de posição das células neoplásicas dentro dos tecidos depende da habilidade delas em migrar e invadir. Assim, esse processo possibilita que as células neoplásicas entrem em vasos sanguíneos ou linfáticos, disseminem para dentro da circulação e proliferem em órgãos distantes (KUDO et al., 2004). Esse evento deve ser bem compreendido, pois o mais importante indicador prognóstico para pacientes com CECP é a metástase para linfonodos cervicais ou para órgãos distantes (FIDLER, 1990).

Encontra-se bem estabelecido na literatura que a MEC relaciona-se diretamente com o comportamento patobiológico das neoplasias, apesar de que por muito tempo, apenas as células neoplásicas foram foco das principais pesquisas.

Assim, para que ocorra a progressão tumoral, posterior invasão e metástase, as células malignas, influenciadas pela MEC, devem sofrer alterações genéticas, representadas, por exemplo, pela promoção da motilidade celular. Essas modificações resultarão na violação da fronteira que fisiologicamente separa as células de diferentes tecidos. Dessa forma, há a necessidade de interações positivas e dinâmicas das células tumorais com o estroma circundante levando, por conseguinte, a alteração do microambiente tecidual e conseqüente falha estrutural e funcional, que são passos da tumorigênese e metástase (BIRCHMEIER; BIRCHMEIER; BRAND-SABERI, 1996; DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2001).

Portanto, é imperativo salientar que a progressão tumoral é marcada por alterações genéticas que são diretamente influenciadas pela MEC e essas modificações controlarão a interação célula-célula e célula-MEC como, também, os

programas de sinalização capazes de estimular ou reprimir a proliferação celular (HANAHAH; WEINBERG, 2000; CROWE et al., 2002). Além disso, no desenvolvimento de metástases é necessário considerar as características intrínsecas das células tumorais, pois as neoplasias, como abordado anteriormente, exibem uma variedade de subpopulações de células (heterogeneidade tumoral). Com isso, células apresentando diferentes potenciais de invasão, por exemplo, podem existir dentro de um mesmo tumor primário (FIDLER, 1990; COTRAN et al., 1994; HANAHAH; WEINBERG, 2000; UCHIDA et al., 2001).

Dessa forma, as células com maior potencial invasivo, ou seja, células da frente de invasão tendem a separar-se da massa tumoral devido a serem funcionalmente independentes, além de apresentarem uma significativa perda de sensibilidade a apoptose, o que lhes confere uma maior agressividade (KUDO et al., 2004; CHRISTOFORI, 2006).

A perda da adesão celular, associada à capacidade de degradação da MEC, devido à síntese de proteínas proteolíticas, e ganho de potencial de migração (motilidade) são passos importantes para que ocorra a invasão tecidual (KUDO et al.; 2004; CHRISTOFORI, 2006). Em alguns casos de carcinomas, essas alterações ocasionam modificações morfológicas que são refletidas na aquisição de um fenótipo fusiforme. Esse fenômeno caracteriza o que se chama de transição epitélio-mesenquimal (TEM) e é resultado direto da supressão da expressão de genes epiteliais e aquisição da expressão de genes mesenquimais (BIRCHMEIER; BIRCHMEIER; BRAND-SABERI, 1996; BOYER; VALLÉS; EDME, 2000).

Na transição do carcinoma *in situ* para carcinoma invasivo há o rompimento da membrana basal (MB), pelo crescimento das células epiteliais neoplásicas que

possuem elevada capacidade proteolítica (STETLER-STEVENSON; LIOTTA; KLEINER, 1993).

A MB, visível ao microscópio de luz, é constituída por duas estruturas: lâmina fibrorreticular, formada por pequenos feixes de fibras reticulares, e lâmina basal, que exhibe cinco componentes principais: colágeno tipo IV, laminina, heparan sulfato, entactina e fibronectina. A MB compartimentaliza os tecidos, facilita a ancoragem de células adjacentes, age como filtro seletivo e estoca macromoléculas. Além disso, por não possuir poros que permitem migração passiva celular, é barreira seletiva para qualquer tipo de célula, além de ter um papel importante em uma série de doenças infecciosas, dermatológicas e tumorais (TARQUINIO, 1999).

A travessia das células neoplásicas pelas barreiras da MB é resultado da síntese de proteínas ativas e a aquisição de um fenótipo invasivo (STETLER-STEVENSON; LIOTTA; KLEINER, 1993).

Kudo et al. (2004) sugeriram que o método de isolamento de clones altamente invasivos é muito proveitoso para se entender melhor à invasão e metástase. Em seu experimento, foram isolados clones invasivos de uma linhagem derivada de CEB usando o método de invasão *in vitro*, com câmaras de invasão, e, assim, demonstraram que nesses clones houve uma redução de caderina-E e β -catenina, moléculas responsáveis pela adesão celular, favorecendo, dessa forma, metástase devido à ligação célula-célula estar prejudicada.

2.4 Matriz Extracelular

As células mantêm contatos entre si através de junções celulares embora também se relacionem por intermédio de uma complexa rede de proteínas e polissacarídeos secretados por elas mesmas e que preenchem os espaços intercelulares, constituindo a MEC, em parte responsável pela diversidade morfológica, funcional e patológica dos diversos tecidos (ALBERTS et al., 1994).

A MEC é constituída por componentes como: colágeno tipo IV, laminina, entactina, nidogeno e heparan sulfato (KEFALIDES, 1973; CHUNG et al., 1979; KANWAR, FARQUHAR, 1979; CARLIN et al., 1981; KLEINMAN et. al., 1982; TIMPL et al., 1983; KLEINMAN et al., 1986). Os polímeros de colágeno e laminina formam uma rede em que o nidogênio e a entactina agem como pontes entre essas moléculas criando ancoragem para diversos outros componentes (YURCHENCO; O'REAR, 1994). Assim, a MEC forma um substrato que fornece condições adequadas para o desenvolvimento, crescimento diferenciação migração, proliferação, morfologia e função de diversos tipos celulares (ALBERTS et al., 1994; TARQUINIO, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000; LEBLEU; MACDONALD; KALLURI, 2007).

As pesquisas realizadas no passado não davam enfoque à interação da superfície celular com a MEC que como já citado apresenta uma ampla série de conseqüências para uma variedade de processos patobiológicos. Desta maneira, a MEC possui papel crítico no estabelecimento de fenótipos diferenciados em vários tecidos. As evidências mais fortes dessa atividade vieram de observações de células transformadas que apresentavam interações anormais com seu ambiente (BOUDREAU; BISSEL, 1998).

2.4.1 modelo tridimensional e Matrigel®

Atualmente, tem sido amplamente discutido o papel sinalizador da estrutura da MEC na atividade de células normais e tumorais, sendo que a sua fração insolúvel, composta na sua maior parte por colágenos, mostra-se capaz de atuar ativamente em eventos como formação, crescimento e homeostase (SCHMEICHEL; BISSEL, 2003).

Análises através de cultivo de células são freqüentemente realizados num substrato sintético, como vidro e plástico, que forçam as células a ajustar-se a um plano artificial rígido fornecido por esses materiais. Apesar deste modelo de cultura celular bidimensional *in vitro* fornecer um conveniente e rápido resultado para análises bioquímicas, ele não demonstra as propriedades encontradas no microambiente tecidual *in vivo*. Portanto, os modelos bidimensionais possuem uso limitado para estudos de funções específicas e sinais estruturais dos tecidos (SCHMEICHEL; BISSEL, 2003).

Estudos indicam que muitas funções específicas de células neoplásicas, tais como motilidade, progressão tumoral, polarização e a diferenciação podem ser mimetizados em microambientes tridimensionais, sendo essa situação fisiológica melhor que a superfície bidimensional (NELSON; BISSELL, 2005; GRIFFITH, SWARTZ, 2006). Desta maneira, os modelos tridimensionais de cultura celular permitem estudos em cenários que lembram o ambiente *in vivo* e, portanto, podem facilitar o entendimento de sinais que regulam a função normal dos tecidos e como esses sinais podem estar alterados nas patologias (SCHMEICHEL; BISSEL, 2003).

Vários substratos têm sido utilizados no cultivo celular tridimensional *in vitro* como, por exemplo, colágeno tipo I e Matrigel®, na tentativa de melhorar a estimulação mecânica e química das células (GOTTWALD et al., 2007; TOH, et al., 2007).

O Matrigel® é uma substância composta por moléculas da MEC obtidas de extrato preparado a partir da MB do tumor Engelbreth-Holm-Swarm. Seus maiores componentes incluem a laminina, o colágeno tipo IV, o heparan sulfato, entactina e o nidogênio. Essa matriz reconstituída se apresenta na forma de gel que é biologicamente ativo e estimula o crescimento e a diferenciação celular (KLEINMAN et al., 1982; KLEINMAN et al., 1986).

2.5 Via do PI3K/Akt

Ultimamente, esta via de transdução de sinal tem sido muito estudada por regular funções celulares normais e fundamentais como: crescimento celular, proliferação, sobrevivência celular, motilidade e angiogênese, processos estes que também são importantes na oncogênese (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999).

É uma via de sinalização intracelular que tem início em resposta a fatores de crescimento, como EGF (*epidermal growth factor*), ou hormônios peptídicos, por exemplo, a insulina, ou ainda componentes da MEC. Essas moléculas ativam receptores tirosino-quinases presentes na membrana plasmática (FEIG, 1993; MORGENSZTERN; MCLEOD, 2005). A ativação da PI3K é subsequente e acontece após a ligação do seu domínio SH2 (homólogo a Src), da subunidade regulatória

p85, a específicos resíduos fosfo-tirosinos, do receptor tirosino-quinase da membrana plasmática ativado. Esta ligação permite o recrutamento da sua subunidade catalítica p110, para a membrana plasmática, com conseqüente ativação da PI3K (CANTLEY, 2002). Todavia, a PI3K também pode ser iniciada através das Ras que são proteínas ativadas transitoriamente em resposta a vários sinais extracelulares como fatores de crescimento, citocinas, hormônios e neurotransmissores, que irão estimular receptores celulares de superfície que incluem receptores tirosino-quinases e receptores transmembrana ligados à proteína G (SHAW; CANTLEY, 2006).

Depois de ativada, a PI3K atua como uma quinase que fosforila lipídeos (fosfoinosítídeos) presentes na camada interna da membrana plasmática, ou seja, converte fosfatidilinositol-4-fosfato e fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4-bifosfato e fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), respectivamente. A PIP3 é responsável pelo recrutamento de proteínas que apresentam o domínio homólogo à pleckstrin (PH), para a membrana plasmática. Entre essas proteínas encontramos as serina/treonina quinase Akt e PDK-1 (fosfatidilinositol quinase-dependente 1) (FRESNO VARA et al., 2004).

A proteína Akt é uma serina/treonina quinase de 59 kDa e é também conhecida como PKB (proteína quinase B) por possuir similaridades em seu domínio catalítico com as proteínas quinase A (PKA) e C (PKC) (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). São conhecidos três membros da família da PKB: PKB α (Akt1), PKB β (Akt2) e PKB γ (Akt3). Parece ser predominante a ativação da proteína Akt1 que está relacionada com a proliferação celular e progressão tumoral, em diferentes tipos de neoplasias (NICHOLSON; ANDERSON, 2002; FRESNO VARA et al., 2004).

Quando na membrana plasmática, a proteína Akt liga-se ao PIP3, sofrendo mudanças conformacionais que permitem sua fosforilação em diferentes sítios. Assim, sua ativação inicial ocorre através da fosforilação no resíduo treonina (Thr308) pela PDK-1, PDK-2 (fosfatidilinositol quinase-dependente 2) e principalmente ILK (quinase ligada a integrina). A sua completa ativação ocorre com a adicional fosforilação no resíduo serina (Ser473), por mecanismos ainda não totalmente identificados, mas que estão envolvidos com a via do mTOR (*mammalian target rapamycin*) (TESTA; BELLACOSA, 2001; NICHOLSON; ANDERSON, 2002; HANADA; FENG; HEMMING, 2004; MASSARELLI et al., 2005; SARBASSOV et al., 2005; MARTIN; BAXTER, 2007; ZHANG et al., 2007). Após sua ativação na membrana plasmática, a Akt passa a ter localização citoplasmática e nuclear (ANDJELKOVIC et al., 1997; MEIER et al., 1997; DUFNER et al., 1999; BORGATTI et al., 2000; FILIPPA et al., 2000;).

Uma vez ativada, a proteína Akt pode atuar, por exemplo, sobre alguns substratos principais promovendo:

- a)** Ativação da proteína IKK α que inibe o I κ B (proteína inibidora de kappa B) provocando a liberação do fator de transcrição NF- κ B, responsável pela indução de genes cuja resposta secundária está envolvida no ciclo celular, como, por exemplo, da Ciclina D1 (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999; JOYCE et al., 1999).
- b)** Ativação da proteína mTOR que regula o crescimento e a proliferação celular pela integração de sinais provenientes de fatores de crescimento, nutrientes e estado de energia da célula (FINGAR; BLENIS, 2004).

- c)** Sobrevivência celular, através da inibição (fosforilação) das proteínas Caspase-9 e Bad que apresentam atividade pró-apoptóticas (DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999; JOYCE et al., 1999).
- d)** Inibição da quinase de síntese de glicogênio (GSK3), responsável entre outras funções pela estabilização da β -catenina no citoplasma (BRUNET et al., 1999; CHANG et al., 2003; LIANG; SLINGERLAND, 2003).
- e)** Inibição (fosforilação) de fatores de transcrição da família forkhead levando a uma diminuição da expressão de proteínas relacionadas com o controle do ciclo celular como, por exemplo, a p27, que atua como inibidora de complexos de Ciclina/CDK (quinase dependente de Ciclina) (BRUNET et al., 1999; KHWAJA, 1999; MEDEMA et al., 2000).
- f)** Estimulação da produção de metaloproteínases (THANT et al., 2000).

Figura 2.4- Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt (Biocarta – <http://www.biocarta.com>)

Assim, a regulação inapropriada da via PI3K/Akt tem sido associada com o desenvolvimento de diversas neoplasias (MARTIN; BAXTER, 2007; ZHANG et al., 2007).

Os genes envolvidos na via de sinalização da proteína Akt parecem ter envolvimento importante na carcinogênese de cabeça e pescoço e, por isso, o estudo destes genes é fundamental para melhorar o entendimento sobre a progressão desta patologia e futuramente aperfeiçoar a terapêutica dos pacientes acometidos. A ativação (fosforilação) permanente da proteína Akt e de sua via de sinalização é um evento freqüente tanto em lesões de CECP quanto em linhagens celulares derivadas destas lesões. Estudos experimentais de modelos de carcinogênese em animais têm demonstrado que a ativação da proteína Akt é um

evento precoce na carcinogênese de cabeça e pescoço (MOLINOLO et al., 2007). Adicionalmente, a ativação persistente da proteína Akt contribui para a manutenção do fenótipo alterado das células (AMORNPHIMOLTHAM et al., 2004).

A via de sinalização do PI3K/Akt é inativada por dois tipos de fosfatase: SHIP (*SH2-containing inositol phosphatase*) e PTEN (fosfatase homóloga a tenasina) que atuam na conversão do PIP2 para PIP3 (DAMEN et al., 1996; CANTLEY; NEEL, 1999). A diminuição da ativação dessa via reduz drasticamente os níveis de Akt ativados (NICHOLSON; ANDERSON, 2002). O gene PTEN, normalmente, está silenciado nas neoplasias malignas devido a mutações ou deleções, levando, dessa forma, à ativação constitutiva da proteína Akt (CANTLEY; NEEL, 1999).

2.6 NF- κ B

O fator nuclear kappa B foi descoberto, por Baltimore e colaboradores, em 1986, via interação com 11 pares de base na cadeia leve do DNA de células *B* relacionando-se com o aumento da produção da cadeia kappa da imunoglobulina (AGGARWAL, 2004). Assim, foi descrito como sendo um fator de transcrição que pode ser ativado por uma variedade de sinais como infecções, estresse oxidativo, carcinógenos, citocinas como fatores de crescimento, fatores de necrose (TNF α), interleucina (IL-1) (CARLSEN et al., 2004).

O fator de transcrição kappa B compreende um conjunto de fatores de transcrição envolvidos na promoção de expressão de mais de 150 genes participantes de uma ampla diversidade de processos biológicos como o de resposta

imune, inflamação e reabsorção óssea, além de estar relacionado com a patogênese de algumas doenças como AIDS, doença cardiovascular, diabetes tipo 2, inflamação crônica e câncer (AGGARWAL, 2004; CARLSEN et al., 2004; KUMAR et al., 2004; PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004).

A família NF- κ B é composta por cinco proteínas: p50, p52, c-Rel (Rel), RelB e RelA (p65). Estas proteínas são conservadas desde a *Drosophila melanogaster* até os humanos e são relacionadas através de um domínio N-terminal, chamado RH (*Rel Homology*), que medeia sua interação com inibidores específicos, translocação para o núcleo, ligação ao DNA e suas dimerizações, pois podem formar homo e heterodímeros (LI; STARK, 2002; AGGARWAL, 2004; KUMAR et al., 2004; PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004; DOLCET et al., 2005). Todavia, na verdade, as proteínas NF- κ B podem ser englobadas em dois grandes grupos. O primeiro é composto pelas proteínas p105 e p100 que não funcionam como fatores de transcrição, mas, são alvos de proteólise e esta quando ocorre, leva a transformação da proteína p105 em p50 e da p100 em p52, gerando proteínas ativas, ou seja, que apresentam a capacidade transcricional (LI; STARK, 2002; AGGARWAL, 2004; PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004; DOLCET et al., 2005;). O segundo grupo de proteínas inclui c-Rel (Rel), RelB e RelA (p65) que, além de apresentarem o domínio RH, possuem um domínio TAD (*Transcriptional Activation Domains*) na região C-terminal. Os domínios TAD promovem transcrição por facilitar o recrutamento de co-ativadores e deslocamento de repressores (LI; STARK, 2002).

As proteínas da família NF- κ B, como já citado anteriormente, podem formar homo e heterodímeros, onde as formas mais comuns ativadas são p50/p65 ou p52/p65 (LI; STARK, 2002). No entanto, a capacidade das proteínas dessa família em realizar a transcrição gênica só é observada quando estão localizadas no núcleo

celular, porém em células não estimuladas, elas estão seqüestradas no citoplasma em função da associação não covalente com membros da família de proteínas inibitórias I κ B (LI; STARK, 2002; KUMAR et al., 2004; DOLCET et al., 2005).

A família I κ B apresenta cinco membros: I κ B α , I κ B β , bcl-3, I κ B ϵ e I κ B γ , que possuem de cinco a sete proteínas de ligação que se unem ao domínio RH das proteínas NF- κ B no citoplasma, inibindo, dessa forma, a translocação para o núcleo (AGGARWAL, 2004; RAVI; BEDI, 2004; DOLCET et al., 2005). Todavia, para que as proteínas NF- κ B liguem-se ao DNA precisam, obviamente, sofrer esse processo de translocação para o núcleo e, para que isso ocorra, uma outra proteína conhecida como IKK necessita ser ativada para poder, então, ser capaz de fosforilar as proteínas I κ B levando-as para ubiquitinação e, conseqüente, degradação. Na ausência das I κ B, NF- κ B entra no núcleo onde atua como fator transcricional (CHANG et al., 2003; DOLCET et al., 2005). Contudo, vale ressaltar que, as I κ B também podem sofrer o processo de translocação nuclear regulando, assim, a função de NF- κ B nesse compartimento. Autores afirmam que ao entrar no núcleo, as I κ B se ligam à subunidade NF- κ B p65 e a conduz para o citoplasma, o que reduz, desse modo, os níveis de p65 e a atividade de NF- κ B no núcleo (AGGARWAL, 2004; RAVI; BEDI, 2004; DOLCET et al., 2005).

Embora não estejam completamente definidos todos os modos de ativação de IKK, acredita-se que essa proteína, que na verdade é um complexo, IKK $\alpha/\beta/\gamma$, seja indispensável para a ativação de NF- κ B. Vale ressaltar que a subunidade IKK β é a maior responsável pela fosforilação das I κ B (DOLCET et al., 2005).

Diversos estímulos, como já citados, ativam vias de transdução de sinal que induzem a ativação e a translocação de NF- κ B do citoplasma para o núcleo, onde ocorre a ativação de genes envolvidos com a sobrevivência celular, por exemplo

(CLARKSON, 2002). Entre essas vias, encontra-se a do PI3K/Akt, pois estudos mostram que o complexo IKK é substrato da proteína Akt que o ativa e, dessa forma, torna-o capaz de fosforilar as proteínas I κ B, permitindo, assim, a conseqüente entrada de NF- κ B no núcleo. Normalmente, essa via está relacionada ao heterodímero p50/p65 da família NF- κ B (LI; STARK, 2002; RAVI; BEDI, 2004).

Figura 2.5- Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt/NF- κ B (Biosciences – http://www.emdbiosciences.com/popup/cbc/NFKB_Interactive_Pathway.htm)

A ativação de NF- κ B deve ser um evento muito bem regulado. Em células normais o NF- κ B só é ativado depois de receber o correto estímulo que o leve a transcrever os genes alvo (CARLSEN et al., 2004). Em células neoplásicas este

mecanismo de regulação pode ser modificado pela alteração de diferentes moléculas e, assim, o NF- κ B pode tornar-se constitutivamente ativado levando a expressão descontrolada de genes sob o seu comando (DOLCET et al., 2005).

O NF- κ B parece ser responsável pela transcrição de muitos genes importantes dentro da via de sinalização celular neoplásica, como exemplo o Bcl-2, Ciclina D1 e c-myc. Existe um sitio específico para κ B dentro do promotor da Ciclina D1, desta forma o NF- κ B ativa diretamente a transcrição da Ciclina D1 e com isso promove a entrada da célula no ciclo celular (JOYCE et al., 2001; RAVI; BEDI, 2004).

Existe uma implicação do NF- κ B como alvo terapêutico de diversas patologias, justamente pela existência de uma grande quantidade de genes que sofrem regulação por este fator de transcrição (GLEZER et al., 2000; PERKINS, 2007).

Com relação ao câncer, a inibição do excesso de ativação de fatores de transcrição, incluindo o NF- κ B constitui-se em uma possibilidade terapêutica interessante e promissora, pois a ativação de NF- κ B não possibilita apenas a transformação maligna e progressão neoplásica, mas favorece também um mecanismo pelo qual as células tumorais tornem-se resistentes a quimioterápicos (BALDWIN, 1996).

2.7 Ciclina D1

2.7.1 ciclinas: panorama geral

As Ciclinas são uma família de proteínas de baixo peso molecular (30-45 kDa), presentes em todas as células eucarióticas, que não exibem atividade intrínseca quando sozinhas, porém constituem-se nas subunidades reguladoras de complexos protéicos indispensáveis para a progressão do ciclo celular, ou seja, as Ciclinas se associam a proteínas com atividade de serina/treonina quinase, as CdkS (quinases dependentes de Ciclinas) (MURRAY; HUNT, 1993; JACKS; WEINBERG, 1998). Essa associação se dá através de domínios de ligação específicos conhecidos como *Cyclin Box*. Após a ligação, o complexo sofre ativação por fosforilação em resíduos de treonina, serina e tirosina por proteínas CAK (*Cdk activating kinase*). Assim, depois de ativado, complexos Ciclina/Cdk, através do domínio catalítico da Cdk conhecido como *core* catalítico, fosforilam e ativam substratos necessários para a progressão em diferentes fases do ciclo celular (JEFFREY et al., 1995).

Oito tipos de Ciclinas humanas são conhecidos: A, B, C, D, E, F, G, H. Sabe-se que a Ciclina D se associa com CdkS 2, 4, 5, 6 para constituir o complexo responsável pela transição $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$, enquanto que a Ciclina E se associa com Cdk2 na interface G_1/S e S , e as Ciclinas A e B se ligam a Cdk 1 e 2 compondo os principais complexos responsáveis pela transição $S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ (HALL; BATES; PETERS, 1995; MORGAN, 1995).

De atividade contrária as Ciclinas, que têm função de promover a progressão do ciclo celular, os inibidores do ciclo celular (Ckis - *cyclin dependent kinase inhibitors*) são, normalmente, proteínas de baixo peso molecular que se ligam a CdkS ou Ciclina/Cdk. De um modo geral, no primeiro caso, estão os inibidores da subclasse INK, constituída por $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$, $p19^{INK4d}$, que se ligam a Cdk 4/6 impedindo a formação de complexos com Ciclinas. No segundo caso, estão

os inibidores da subclasse KIP, constituída por $p21^{Waf1/Cip1}$, $p27^{Kip1}$, $p57^{KIP2}$, que se ligam aos complexos Ciclina/Cdk já formados impedindo sua atividade quinásica (HALL; BATES, PETERS, 1995; MORGAN, 1995).

Diferentemente das Cdk, que possuem expressão constitutiva ao longo de todo o ciclo celular, as Ciclinas e os Ckis estão presentes somente em momentos específicos do ciclo celular. A indução dessas proteínas ocorre quando as células deixam seu estado quiescente e entram no ciclo celular, mas para isso requerem fatores de crescimento e aderência a componentes da MEC que estimulam uma cascata de eventos pelo qual o sinal é transmitido ao núcleo, resultando na ativação de fatores de transcrição. Assim, a progressão ao longo do ciclo eucariótico depende da expressão antagônica de Ciclinas e Ckis, que se alternam na regulação da atividade das Cdk (MICHALIDES, 1999).

Figura 2.6- Esquema ilustrativo das fases do ciclo celular de mamíferos (FORTI, 2001)

2.7.2 ciclina D1

Como já citado no item anterior, oito tipos de Ciclinas humanas são conhecidos: A, B, C, D, E, F, G, H. A Ciclina D apresenta três subtipos - D1, D2, D3 – possui uma meia-vida de aproximadamente 38 minutos, e é extremamente instável (GOODGER et al., 1997). A Ciclina D1 forma complexos com a Cdk 4 e 6, e está envolvida na transição da fase G1 para a fase S (ponto de restrição – ponto R) do ciclo celular. O alvo final deste complexo é a proteína do retinoblastoma (Rb). A Rb, após fosforilada, libera fatores de transcrição, como E2F, por exemplo, que são requisitados para a transcrição de genes, os quais codificam proteínas envolvidas na síntese do DNA e mandatórias para a progressão do ciclo celular, ou seja, o E2F leva a amplificação de Ciclinas, como a D1, levando a célula à progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (GOODGER et al., 1997; CHEN et al., 1999).

Estudos experimentais mostram que a Ciclina D pode funcionar como oncogene, cooperando com outros genes na transformação celular (KUO et al., 1999). Entre os três tipos de Ciclinas, a Ciclina D1 apresenta maior importância e correlação com o câncer (DIEHL, 2002).

O gene da Ciclina D1 tem sido freqüentemente amplificado ou superexpresso em vários tipos de carcinoma humano, incluindo os CECp (MOTOKURA; ARNOLD, 1993; CALLENDER et al., 1994; EL-NAGGAR; STECK; BATSAKIS, 1995). A presença desta proteína está relacionada a um prognóstico menos favorável, já que os tumores que a sintetizam em excesso são mais agressivos e invasivos (MASUDA et al., 1996; MATE et al., 1996; SHIN et al., 1997).

Pesquisas indicam que o NF- κ B age aumentando os níveis de Ciclina D1. A relação do NF- κ B com o ciclo celular e principalmente com a Ciclina D1 foi demonstrada utilizando o I κ B “super repressor”, para inibir a atividade do NF- κ B, ou seja, esse complexo bloqueia o aumento da atividade nuclear do NF- κ B e atrasa a entrada de células na fase S do ciclo celular (BALDWIN, 1996; JOYCE et al., 2001; PERKINS, 2007).

A consequência da superexpressão de Ciclina D1 é uma transição encurtada do ciclo celular que confere uma vantagem proliferativa às células e talvez limite a capacidade de reparação aos danos genômicos causados pela exposição à carcinógenos (PETTY; DRAGNEV; DMITROVSKY, 2003).

3 PROPOSIÇÃO

Baseando-se nas evidências expostas na revisão de literatura, o presente trabalho teve como proposta:

- I. Analisar, através de métodos quantitativos e qualitativo, a expressão das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1 em linhagens celulares derivadas de CECP, HN6 (base de língua), HN30 (faringe) e HN31 (linfonodo), cultivadas em ambiente tridimensional (Matrigel[®]) e comparar os resultados com aqueles encontrados em modelo de cultura de células bidimensional, ou seja, convencional.

Com isso, objetivou-se avaliar se células cultivadas em um microambiente *in vitro*, mas com características que o aproximavam mais do *in vivo*, exibem diferenças significativas no comportamento de componentes de uma das vias de sinalização mais estudada em CECP, a via PI3K.

- II. Identificar, em clones invasivos (HN6.1, HN31.1, HN31.1), gerados a partir de ensaio de câmara de invasão, possíveis alterações na expressão das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1 em relação ao grupo controle, representado pelas mesmas linhagens, sem a realização de qualquer ensaio.

Dessa forma, objetivou-se analisar a participação da via de sinalização PI3K/Akt/NF- κ B no processo de invasão de células derivadas de CECP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo Celular

Para realização desse estudo foram utilizadas três linhagens celulares humanas derivadas de CECP, conforme especificadas na tabela 4.1. As linhagens celulares HN30 e HN31 apresentavam níveis normais do receptor de EGF (CARDINALI et al., 1995).

A origem e o estágio clínico do tumor segundo o critério TNM podem ser visualizados na Tabela 4.1 (CARDINALI et al., 1995).

Tabela 4.1- Origem das linhagens celulares de CECP e sua classificação segundo o critério TNM. O número sobrescrito indica par de linhagens celulares oriundas do mesmo paciente

	HN6	HN30¹	HN31¹
ORIGEM	Língua (Base)	Faringe	Linfonodo
ESTÁGIO CLÍNICO	T3N2bM0	T3N0M0	T3N0M0

As células foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 2 min. e transferidas para frascos de cultivo. As três linhagens foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica–antimicótica (Sigma Chemical Ca, St. Louis, MO, USA). As células foram mantidas em frascos a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Toda a manipulação foi realizada em capela de fluxo laminar, o crescimento das células monitorado diariamente em microscópio invertido de

contraste de fase (Zeiss®Axiovert 25 – Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha) e o meio de cultura trocado de acordo com o metabolismo celular.

Após ocuparem 70% do frasco, o que se denomina subconfluência, o meio de cultura era removido, separado em tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada, duas vezes, com solução tampão fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS), pH 7.2, para que em seguida, as células fossem dissociadas com solução de tripsina acrescida de 0.25% EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) 1mM durante 5 min. a 37°C. As células em suspensão eram, assim, transferidas para o tubo de centrifugação, previamente reservado, e centrifugadas a 1300 rpm por 5 min., à temperatura ambiente. Essa etapa tinha por objetivo inativar, com o SFB, contido no meio de cultura, a tripsina. O sobrenadante resultante era aspirado e o precipitado de células ressuspensionado em novo meio de cultura para que alíquotas da suspensão fossem distribuídas em frascos de cultivo e, novamente, levadas à estufa, onde cada procedimento deste dava origem a uma nova passagem celular.

De cada passagem, amostras das células crioprotegida com 10% de di-metil sulfóxido (DMSO – Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA) foram congeladas e mantidas em recipiente contendo nitrogênio líquido.

4.2 Ensaio de Cultivo Tridimensional para posterior realização da técnica de Imunofluorescência

A preparação do Matrigel[®] (BD Matrigel[™], Basement Membrane Matrix – cat. Number 35623 - San Jose, CA USA) visou o crescimento das células em ambiente tridimensional e permitiu, dessa forma, a interação célula-MEC.

A solução estoque de Matrigel[®] foi descongelada “overnight” em refrigerador a 4°C, para evitar sua geleificação prematura. Toda a manipulação do Matrigel[®] realizou-se à temperatura de 4°C, no interior do fluxo laminar. As ponteiras utilizadas em sua preparação, os tubos para diluição, lamínulas, bem como as placas que continham as lamínulas, foram previamente resfriadas a 4°C, conforme instruções do fabricante.

Primeiramente, foi preparado o meio de cultivo tridimensional em que as células deveriam ser ressuspensas para depois serem plaqueadas em lamínulas de vidro. Esse meio era composto de DMEM sem SFB e Matrigel[®], na proporção 1:3, e, segundo o fabricante, a quantidade de meio necessária para ressuspender as células era de 150 µL/cm², para que, assim, pudessem crescer em um ambiente tridimensional. A Imunofluorescência foi realizada sob lamínulas de vidro com diâmetro compatível com placas de 6 poços.

Foram plaqueadas 2x10⁵ células/lamínula e a mistura DMEM (sem SFB), Matrigel[®] e células permaneceu à temperatura de 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 24 horas para que ocorresse a geleificação do material. Posteriormente, sob essa estrutura semi-sólida resultante, foi adicionado DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de solução antibiótica – antimicótica (Figura 4.1). Após 72 horas de cultivo tridimensional, foram realizadas as reações de Imunofluorescência (descrita no item 4.4) para os anticorpos pAkt, NF-κB e Ciclina D1 com o objetivo de se analisar o padrão de marcação mediado pela MEC.

Figura 4.1-Esquema do modelo de cultura tridimensional (SODUNKE et al., 2007)

4.3 Ensaio de Invasão Celular

Para a realização do ensaio de invasão foram utilizadas câmaras bipartidas. Essas câmaras eram compostas por dois compartimentos distintos, separados entre si por um filtro de polycarbonato (Individual Millicell cell culture inserts available for 6 well plates – Millipore Corporate Headquarters), com poros de 8 μm de diâmetro. Esse sistema cria dois ambientes diferentes que permite a passagem voluntária das células de um lado para o outro do filtro, já que o diâmetro dos poros é consideravelmente menor que o diâmetro das células.

Os filtros foram cobertos por uma fina camada de Matrigel[®]. Para isso, a solução estoque de Matrigel[®] precisou ser descongelada “overnight” no refrigerador, à temperatura de 4°C, para evitar sua geleificação prematura. Em seguida, essa solução estoque foi diluída em DMEM sem SFB, na proporção 1:3 e, então, 30 μL dessa mistura foram espalhados homogeneamente sobre cada filtro, de modo a formar uma fina camada. As câmaras contendo os filtros foram então colocadas na estufa a 37°C por 1 hora para total geleificação do Matrigel[®]. Vale lembrar que, toda

a manipulação do Matrigel® foi realizada a 4 °C e que as ponteiros utilizadas em sua preparação, tubos para diluição, bem como os filtros de polycarbonato foram previamente resfriados a 4 °C, conforme instruções do fabricante.

As linhagens celulares HN6, HN30, HN31 foram plaquaedadas sob os filtros de polycarbonato recobertos por Matrigel® (2×10^5 células/filtro). Foi acrescido DMEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de solução antibiótica – antimicótica tanto no compartimento superior quanto no inferior das câmaras bipartidas (Figura 4.2). Após 5 dias, as células com maior capacidade de invasão atravessaram o Matrigel® e ficaram na parte inferior do filtro, do qual foram, então, retiradas (tripsinização) e cultivadas em garrafas de cultura por mais quatro passagens.

Essas células tratadas, ou clones invasivos, foram denominados HN6.1, HN30.1, HN31.1 e semeados em lamínulas de vidro até alcançarem a subconfluência para poder ser então realizada a técnica de Imunofluorescência. Além disso, foram cultivados em placas de 100 mm de diâmetro para posterior extração protéica e execução da técnica de Western Blot.

Figura 4.2- Representação da câmara bipartida separada por filtro de polycarbonato de 8 µm de diâmetro (Adaptado de BMG LABTECH - <http://www.bmglabtech.com/application-notes/fluorescence-intensity/fluoroblock-fluostar-144.cfm>)

4.4 Técnica de Imunofluorescência

A Imunofluorescência foi realizada sob lamínulas de vidro com diâmetro compatível com placas de 6 poços.

Como controle, as mesmas linhagens celulares submetidas aos ensaios propostos (ambiente tridimensional e câmara de invasão) foram cultivadas apenas sobre lamínulas de vidro (cultivo bidimensional) até atingirem a subconfluência.

Assim, as lamínulas contendo as células submetidas ao cultivo bidimensional, tridimensional ou ensaio de invasão, foram lavadas duas vezes com PBS e depois fixadas com metanol por 6 min., a -20°C. Após esse período, as lamínulas foram novamente lavadas com PBS para a posterior realização do bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de PBS + BSA (albumina sérica bovina) a 1% (50 µL/lamínula), por 30 min.

As lamínulas foram, então, outra vez lavadas com PBS e os anticorpos primários anti pAkt, NF-κB e Ciclina D1 foram diluídos em solução de bloqueio e incubados (50 µL/lamínula), conforme dados da tabela 4.2. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS para que fossem incubadas, por 45 min., com anticorpo secundário (50 µL/lamínula) [Fluoresceína IgG (H+L), Vector Laboratories, Ind.Burlingame, CA, USA] na concentração 1:50, também diluído em solução de bloqueio. Nessa etapa, a reação foi realizada na ausência de luz. Por fim, as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas em lâminas de vidro com Vecta Shild® (Vector Laboratories, Ind.Burlingame, CA, USA).

As lamínulas foram fixadas com o uso de esmalte incolor e armazenadas na geladeira, na ausência de luz, para posterior análise no microscópio de

imunofluorescência (Axio Imager.A1-Zeiss, Câmera: Axio Cam HRc-Zeiss, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Tabela 4.2- Especificações técnicas dos anticorpos utilizados no ensaio de Imunofluorescência

Anticorpo	Origem	[]	Procedência	Clones	Incubação
pAkt	Rabbit	1:50	Santa Cruz	sc7985	90 min.
NF-κB	Rabbit	1:50	Zymed	P65C	90 min.
Ciclina D1	Mouse	1:100	Santa Cruz	sc8396	60 min.

4.5 Técnica de Western Blot

4.5.1 extração protéica de células cultivadas em ambiente tridimensional

As linhagens celulares HN6, HN30 e HN31 foram semeadas em garrafas de cultura de 75cm² de área. Após terem alcançado 90% de confluência, as células foram removidas das garrafas por tripsinização, centrifugadas e o precipitado ressuspenso diretamente em 1 mL de Matrigel[®] com DMEM sem SFB, na diluição de 1:3.

Como já dito, a solução de estoque de Matrigel[®] foi descongelada “overnight” em refrigerador a 4°C, para evitar sua geleificação prematura, e toda sua manipulação ocorreu à temperatura de 4°C. As ponteiros utilizadas em sua

preparação, bem como os tubos para diluição e posterior armazenamento, foram previamente resfriados a 4°C, conforme instruções do fabricante.

O Matrigel® contendo as células foi, então, depositado dentro de tubos de congelamento para o crescimento tridimensional, mantidos à temperatura de 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, pelo período de 72 horas. Após esse tempo, as células foram lisadas para obtenção do extrato protéico.

Assim, ao tubo contendo as células em ambiente tridimensional, foram adicionados, 0,5 mL de PBS gelado para posterior centrifugação a 15000 rpm, por 10 min., a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e pellet misturado com PBS gelado e recentrifugado. Mais uma vez o sobrenadante foi eliminado e o pellet ressuspendido em 1 mL de tampão RIPA⁺ [50 mM Tris HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1mM EDTA; 1% Triton X-100; 1% desoxicolato de sódio; 0.1% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*)] acrescido de 10 µL/mL de um conjunto de inibidores de protease (Chemicon, Sigma, St. Louis, MO), mantido a 4°C, por 15 min. Após esse período, as células com o tampão RIPA⁺ foram centrifugadas a 15000 rpm, por 20 min., a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi recolhido, aliquoteado e estocado a -80°C, para posterior quantificação.

4.5.2 extração protéica de células cultivadas em ambiente bidimensional e dos clones invasivos

Após remover o meio de cultura, as placas contendo as células em 70-80% de confluência foram lavadas três vezes com PBS gelado e mantidas a 4°C. A

extração protéica foi realizada com auxílio do tampão RIPA⁺ (50 mM Tris HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1mM EDTA; 1% Triton X-100; 1% desoxicolato de sódio; 0.1% SDS) acrescido de 10 µL/mL de um conjunto de inibidores de protease (Chemicon, Sigma, St. Louis, MO), por 15 min. e então as placas foram raspadas e as amostras centrifugadas a 15000 rpm, por 20 min., a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, aliquoteado e estocado a -80°C, para posterior quantificação.

4.5.3 quantificação protéica

As proteínas dos lisados foram quantificadas através do método do ácido biocinconinico (BCA Protein Assay Reagent Kit – Pierce Chemical CO, Rockford, IL, USA), seguindo as instruções do fabricante. Esse método tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre (Cu^{2+}) resultando na redução do mesmo, formando um complexo de peptídeos com o cátion cuproso (Cu^+). Por sua vez, o ácido biocinconinico reage com o cátion cuproso, formando o complexo BCA-Cu^+ , produzindo uma cor púrpura que é lida no espectrofotômetro (Elisa-ELX 800 Bio-Tek Instruments, Inc.), 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.

4.5.4 western blotting propriamente dito

As alíquotas do lisado, contendo 7 µg de proteína total, foram misturadas com tampão de amostra, para concentração final de 1x. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 min. e submetidas à SDS-PAGE. A eletroforese foi realizada a 120V durante 3 horas, em gel de bis-acrilamida com gradiente de 10-15%, dependendo da proteína analisada. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope® (Bio Rad, Hercules, Califórnia, USA).

A transferência das proteínas que migraram do gel para uma membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham CO, Arlington Heights, IL, USA) foi feita por eletrotransferência úmida em aparelho especial (Höefer, mini VE, Amersham CO, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Com o tampão de transferência (48mM Tris Base; 39mM Glicina; 20% Metanol; pH 8.3) utilizado como recomendado pelo fabricante, a transferência foi feita com 70mA por 3 horas. Após essa etapa, a membrana foi submetida à fase de bloqueio.

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

- 1) Anticorpo fosforilado (pAkt): bloqueio realizado com BSA a 1% em TBST (0,9% NaCl; 10mM Tris HCl pH 7.5; 0,1% Tween 20), por 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação.
- 2) Demais anticorpos (NF-κB e Ciclina D1): bloqueio realizado com 5% de leite em pó desnatado em TBST (0,9% NaCl; 10mM Tris HCl pH 7.5; 0,1% Tween 20), por 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação.

Em seguida, a solução de bloqueio foi removida lavando-se a membrana com TBST e o anticorpo de interesse (anti pAkt, NF-κB e Ciclina D1) diluído em sua respectiva solução de bloqueio e aplicado de acordo tabela 4.3, a 4°C. Seguiram-se duas lavagens com TBST, de 10 min. cada, sob agitação e à temperatura ambiente,

para remoção do anticorpo não-absorvido O anticorpo secundário foi diluído 1:3000, em solução de bloqueio, e aplicado por 2 horas, sob agitação. Após esse tempo, a membrana foi lavada em TBST, por três passagens (10 min. cada).

A detecção colorimétrica foi feita através do kit Opti-4CN (Bio Rad, Hercules, Califórnia, USA), segundo instruções do fabricante. A membrana foi incubada no substrato por até 30 min., no escuro, depois lavada em água deionizada por 15 min., e pronta para documentação.

Como controle do volume total de cada amostra foi utilizado o anticorpo β -actina (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA).

Tabela 4.3- Especificações técnicas dos anticorpos utilizados no ensaio de Western Blot

Anticorpo	Origem	[]	Procedência	Clones	Incubação
pAkt	Rabbit	1:150	Santa Cruz	sc7985	“overnight”
NF-κB	Rabbit	1:100	Zymed	P65C	“overnight”
Ciclina D1	Mouse	1:100	Santa Cruz	sc8396	“overnight”
B-actina	Mouse	1:7000	Sigma	AC-15	2 horas

4.5.5 análise western blotting

O western blotting indicou a expressão das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1 quantitativamente, mostrando a real resposta celular frente ao tratamento aplicado.

A) Análise Densitométrica

As imagens foram adquiridas por um escaneador de imagens e as bandas das proteínas das amostradas tratadas e controles foram comparadas (em função dos pixels e da área da banda) utilizando o “software” IMAGE J 1.33u (programa de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband NIMH, NIH, USA). Os resultados foram apresentados em forma de gráfico mostrando o valor que cada banda ocupa em relação à área selecionada.

B) Análise Estatística

Os valores obtidos da análise densitométrica foram avaliados através do programa SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os valores em triplicata foram analisados através do teste t de *Student*. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Imunofluorescência

5.1.1 modelo de cultivo tridimensional

A imunofluorescência mostrou que independente do modelo de cultura adotado, bidimensional ou tridimensional, as linhagens celulares HN6, HN30 e HN31 expressaram as proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1.

Em relação ao padrão de expressão intracelular da proteína pAkt, quando o modelo bidimensional foi adotado, a marcação revelou-se citoplasmática e nuclear para as linhagens celulares HN6 e HN30 (Figura 5.1 A, B), porém, na HN6, foram observadas também áreas de intensa marcação apenas nuclear (Figura 5.1 A'). Além disso, a expressão no caso da linhagem celular HN31 foi predominantemente nuclear (Figura 5.1 C). Já em contato com o Matrigel[®], as linhagens celulares HN6 e HN31 (Figura 5.1 D, F) apresentaram positividade marcadamente nuclear, ao contrário da linhagem celular HN30, que exibiu expressão citoplasmática e nuclear (Figura 5.1 E)

No caso do fator de transcrição NF- κ B, para todas as linhagens celulares estudadas e modelos de cultivo celular adotados, a marcação apresentou-se predominantemente citoplasmática (Figura 5.2 A, B, C, D, E, F), ao contrário da

proteína Ciclina D1, na qual se notou expressão exclusivamente nuclear (Figura 5.3 A, B, C, D, E, F).

Além da localização intracelular das proteínas propostas neste estudo, pela técnica de imunofluorescência também se notou que as linhagens celulares derivadas de CECF, quando cultivadas em Matrigel[®], mostraram-se bem adaptadas e sem qualquer sinal de sofrimento (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 - D, E, F). Ademais, essas células exibiram um notável padrão de crescimento, formando colônias [Figuras 5.1 (D, F), 5.2 (D, E, F) e 5.3 (D, E, F)], diferente do das células cultivadas em ambiente bidimensional.

5.1.2 ensaio de invasão celular

A técnica de imunofluorescência mostrou que tanto as linhagens controle como as linhagens submetidas à câmara de invasão expressaram as proteínas propostas neste estudo.

A proteína pAkt, como citada no item 5.1.1, apresentou imunopositividade citoplasmática e nuclear para as linhagens celulares HN6 e HN30 (Figura 5.1 A, B) e nuclear para a linhagem celular HN31 (Figura 5.1 C). Todavia, seus respectivos clones invasivos apresentaram marcante positividade nuclear (Figura 5.1 H, I), com exceção da linhagem HN6.1, na qual se notou marcação citoplasmática e nuclear (Figura 5.1 G), sendo que a expressão citoplasmática apresentou-se em forma de rede (Figura 5.1 G).

O fator de transcrição NF- κ B, também citado anteriormente, apresentou marcação positiva em todas as linhagens celulares controle e de localização marcadamente citoplasmática (Figura 5.2 A, B, C). Contudo, o clone invasivo HN31.1 mostrou predomínio de marcação citoplasmática (Figura 5.2 I) e as linhagens invasivas HN6.1 e HN30.1 apresentaram tanto positividade citoplasmática como evidente marcação nuclear (Figura 5.2 G, H).

Por fim, a proteína Ciclina D1 revelou positividade exclusivamente nuclear, independente da linhagem ou tratamento (Figura 5.3 A, B, C, G, H, I).

Figura 5.1- Localização da proteína pAkt nas linhagens celulares HN6, HN30 e HN31, nos grupos: controle (cultivo bidimensional), cultivo tridimensional e clones invasivos (ensaio de invasão)

Figura 5.2- Localização da proteína NF-κB nas linhagens celulares HN6, HN30 e HN31, nos grupos: controle (cultivo bidimensional), cultivo tridimensional e clones invasivos (ensaio de invasão)

Figura 5.3- Localização da proteína Ciclina D1 nas linhagens celulares HN6, HN30 e HN31, nos grupos: controle (cultivo bidimensional), cultivo tridimensional e clones invasivos (ensaio de invasão)

5.2 Western Blotting

5.2.1 modelo de cultivo tridimensional

Confirmando os resultados obtidos pela técnica de imunofluorescência, todas as linhagens celulares estudadas expressaram as proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1 (Figura 5.4 A). Entretanto, diferenças quantitativas em suas expressões foram notadas quando os modelos de cultura celular desenvolvidos foram comparados (Figura 5.4 B).

Os maiores níveis de expressão das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1 foram observados na linhagem celular HN6, em ambas as formas de cultivo celular adotados (Figura 5.4 B). Interessante notar que, no cultivo celular tridimensional, as linhagens celulares HN30 e HN31 mostraram comportamentos similares na expressão das proteínas analisadas, adicionalmente, no cultivo bidimensional, essas mesmas linhagens exibiram níveis semelhantes de expressão dessas proteínas (Figure 5.4 B).

As bandas fornecidas pela técnica de Western Blot revelaram uma diminuição nos níveis de expressão das proteínas estudadas quando as células foram cultivadas em contato com o Matrigel[®], sendo, na maioria das vezes, essa redução estatisticamente significativa, exceto no caso da linhagem celular HN6, que apresentou um aumento significativo nos níveis de Ciclina D1 ($p < 0.05$; Figure 5.4 B; Tabela 5.1).

As maiores diminuições nos níveis de expressão, independente da proteína analisada, foram observadas na linhagem celular HN31, submetida ao cultivo tridimensional, seguida pelo baixo nível de expressão da proteína Ciclina D1, detectado no modelo de cultivo tridimensional para a linhagem celular HN30 ($p < 0.05$; Figure 5.4 B; Tabela 5.1).

Tabela 5.1- Análise estatística dos valores da quantificação das bandas das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1, em ambos os modelos de cultivo celular, obtidas a partir da técnica de Western Blot (* $p < 0.05$ - teste t de *Student*)

	pAkt^{2D} x pAkt^{3D}	NF-κB^{2D} x NF-κB^{3D}	Ciclina D1^{2D} x Ciclina D1^{3D}
HN6	* $p=0.006$	$p=0.001$	$p=0.016$
HN30	$p=0.197$	$p=0.034$	$p=0.003$
HN31	$p=0.000$	$p=0.013$	$p=0.013$

5.2.2 ensaio de invasão celular

A técnica de Western Blot confirmou os resultados obtidos na imunofluorescência, ou seja, todas as linhagens celulares estudadas expressaram as proteína pAkt, NF- κ B e Ciclina D1 (Figura 5.5 A). Entretanto, diferenças quantitativas em suas expressões foram notadas entre o grupo controle e tratado, ou seja, submetido a ensaio de câmara de invasão (Figura 5.5 B).

Os maiores níveis de expressão das proteínas analisadas foram observados na linhagem celular HN6, independente do grupo experimental analisado (Figura 5.5 B).

Um aumento significativo nos níveis de expressão das proteínas pAkt e NF- κ B foi notado nas linhagens invasivas HN6.1 e HN30.1 ($p < 0.05$; Figure 5.5 B; Tabela 5.2). Todavia, no caso do clone invasivo HN31.1, observou-se aumento no nível de expressão da proteína pAkt e discreta diminuição de NF- κ B, mas ambos os valores não foram estatisticamente significantes ($p > 0.05$; Figure 5.5 B; Tabela 5.2).

A proteína Ciclina D1 apresentou aumento dos seus níveis de expressão em todas as linhagens invasivas, sendo que apenas na HN6.1 esse aumento foi estatisticamente significativo ($p < 0.05$; Figure 5.5 B; Tabela 5.2).

Tabela 5.2- Análise estatística dos valores da quantificação das bandas das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1, controle e tratadas (.1), obtidas a partir da técnica de Western Blot (* $p < 0.05$ - teste t de *Student*)

	pAkt x pAkt^{.1}	NF-κB x NF-κB^{.1}	Ciclina D1 x Ciclina D1^{.1}
HN6	* $p=0.012$	$p=0.036$	$p=0.044$
HN30	$p=0.037$	$p=0.017$	$p=0.087$
HN31	$p=0.393$	$p=0.452$	$p=0.470$

Figura 5.4- (A) Bandas das proteínas pAkt, NF-κB e Ciclina D1 obtidas a partir da técnica de Western Blot - células submetidas a cultivo tridimensional (B) Representação gráfica da média de valores da quantificação das bandas protéicas

Figura 5.5- (A) Bandas das proteínas pAkt, NF-κB e Ciclina D1 obtidas a partir da técnica de Western Blot - células submetidas a ensaio de invasão (B) Representação gráfica da média de valores da quantificação das bandas protéicas

6 DISCUSSÃO

Como abordado previamente, com aproximadamente 500.000 novos casos/ano, o CECP representa 90% de todas as neoplasias malignas dessa região e é a sexta dentre todas as várias malignidades que afetam o homem (FRANCESCHI et al., 2000; BSOUL; HUBER; TEREZHALMY, 2005; CHEN et al., 2006). Metade dos pacientes diagnósticos com CECP morre em cinco anos, sendo o tempo de sobrevida bem menor do que o de outras neoplasias como mama, cólon, reto, cérvix (JEMAL et al., 2008). Assim, a busca por uma resposta terapêutica mais eficaz e menos agressiva para esse tipo de tumor tem levado a um constante estudo a respeito dos mecanismos de carcinogênese e progressão tumoral dos CECP.

As células epiteliais exibem características histológicas, como, por exemplo, polarização ou estruturas especializadas na adesão intercelular e entre a célula-lâmina basal, que são críticas para a manutenção da sua forma e funções. Todavia, no caso dos tumores de origem epitelial, carcinomas, essa intacta e bem ordenada arquitetura acaba por se romper (BISSELL; RADISKY, 2001).

Durante o desenvolvimento do câncer, as células neoplásicas adquirem inúmeras características fenotípicas devido à interação entre fatores externos e internos. Os fatores externos são aqueles provenientes da MEC e os internos são representados por alterações genéticas que controlam a interação entre as células e a sua MEC, além de também coordenarem os programas de transdução de sinal capazes de estimular ou reprimir a proliferação celular (HANAHA; WEINBERG, 2000). A somatória desses eventos culmina com a perda de adesão célula-célula, degradação da MEC, aumento do potencial de migração e invasão tecidual que

gera, finalmente, a metástase tumoral (BIRCHMEIER; BIRCHMEIER; BRAND-SABERI, 1996).

Atualmente, tem sido amplamente discutido o papel sinalizador da estrutura da MEC na atividade de células normais e tumorais, sendo que a matriz insolúvel, composta na sua maior parte por colágeno, mostra-se capaz de atuar ativamente em eventos como formação, crescimento e homeostase (RAMIREZ; RIFKIN, 2003; SCHMEICHEL; BISSELL, 2003).

Estudos mostram que o modelo de cultivo de células em ambiente bidimensional, ou seja, monocamada sobre superfícies rígidas, de plástico ou vidro, não é capaz de fornecer as características necessárias para que o desempenho celular *in vitro* seja semelhante ao *in vivo*, principalmente, no caso de células tumorais, que apresentam grande variabilidade, cuja expressão gênica e comportamento biológico são facilmente modulados pelo microambiente extracelular e condições de cultura (DEBNATH; MUTHUSWAMY; BRUGGE, 2003; WANG et al., 2005).

Além disso, muitos processos biológicos, tais como progressão tumoral, diferenciação e invasão celular, podem ser melhor elucidados em microambientes tridimensionais simulando uma situação fisiológica mais adequada do que as superfícies bidimensionais rígidas (GRIFFITH; SWARTZ, 2006). Dessa forma, há a necessidade de se estudar as células derivadas de CECP em íntimo contato com a MEC.

Baseando-se nisso, proteínas relacionadas à proliferação, motilidade, invasão, metástase e controle da apoptose celular estão em evidência devido ao seu envolvimento na carcinogênese e progressão tumoral. Dentre essas proteínas

podemos citar as que pertencem a via de transdução de sinal PI3K, como, por exemplo, Akt, NF- κ B e Ciclina D1, que foram alvo deste estudo.

6.1 Modelo de Cultura Tridimensional: Influência na expressão das proteínas da via de sinalização PI3K

Para mimetizar a relação célula-MEC, foi utilizado neste estudo, o cultivo tridimensional em Matrigel[®], MB reconstituída. Optou-se pela utilização desse material, pois possui alguns componentes em comum com a MEC tecidual, como, por exemplo, proteínas fibrilares (laminina e entactina), microfibrilares (colágeno IV) e não fibrilares (heparan sulfato) (KLEINMAN et al., 1982; KLEINMAN et al., 1986).

A literatura relata dois tipos de cultivo tridimensional: células semeadas sobre uma camada de Matrigel[®] solidificada medindo entre 1-2mm de espessura ou células ressuspendidas em um meio semi-sólido contendo Matrigel[®], ou seja, células crescendo totalmente embebidas nesse material (DEBNATH; MUTHUSWAMY; BRUGGE, 2003). Neste trabalho, optou-se pelo segundo método por já ser adotado pelo laboratório onde este estudo foi desenvolvido. Além disso, não há um consenso na literatura sobre qual a melhor metodologia, pois a sua eficiência parece estar diretamente relacionada com o tipo de célula a ser cultivada e o propósito do estudo.

O presente trabalho mostrou, através da técnica de Imunofluorescência, que as células derivadas de CECF quando cultivadas em Matrigel[®] apresentaram-se bem adaptadas e sem qualquer indício de sofrimento, o que poderia indicar uma não adaptação a esse ambiente tridimensional (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 - D, E, F). Esse

fato comprova a capacidade do Matrigel® em mimetizar o microambiente em que a célula vive, já que nutrientes básicos para a sobrevivência celular estão presentes. Essas células exibiram também um notável padrão de crescimento distinto do das células cultivadas em ambiente bidimensional. Nas Figuras 5.1 (D, F), 5.2 (D, E, F) e 5.3 (D, E, F), as células cultivadas em contato com o Matrigel® proliferaram formando colônias o que provavelmente implicaria em uma alteração na expressão, qualitativa e quantitativa, de proteínas relacionadas à proliferação e migração. Essa hipótese, foi corroborada tanto pela técnica de Imunofluorescência quanto pela de Western Blot, que serão melhor abordadas futuramente.

Atualmente, a via de sinalização PI3K tem sido apontada como uma das vias mais afetadas nos cânceres que freqüentemente acometem o homem, provavelmente, devido ao fato de que mutações em um ou mais de seus componentes ocorram em acima de 30% dos casos (CULLY et al., 2006), resultando em um aumento do potencial proliferativo e metastático, além da resistência a terapias antitumorais (HENNESSY et al., 2005; CULLY et al., 2006).

Como já explicado anteriormente, o produto direto da atividade da PI3K, que atua como uma quinase, são lipídeos (fosfoinosítídeos) presentes na camada interna da membrana plasmática, resultando na conversão de PIP2 em PIP3. A PIP3 é responsável pelo recrutamento de proteínas para a membrana plasmática. Entre essas proteínas encontramos as serina/treonina quinase Akt e PDK-1 (FRESNO VARA et al., 2004). Esta última, por sua vez, fosforila Akt, ativando-a. A identificação dos substratos da proteína Akt tem sido alvo de numerosos estudos para o entendimento do impacto da sua ativação nos mecanismos de proliferação e apoptose celulares, ou seja, nas etapas que envolvem o desenvolvimento de neoplasias malignas (LUO; MANNING; CANTLEY, 2003).

A proteína Akt inibe a morte celular através da inativação de fatores próapoptóticos, ativação de fatores de transcrição que superexpressam genes antiapoptóticos, incluindo o fator de transcrição NF- κ B, um essencial componente de regulação intracelular dos mecanismos de proliferação e sobrevivência celulares (KARIN; GRETEN, 2005).

Em células de CECP, a expressão e atividade do NF- κ B está, geralmente, superexpressa e seus níveis aumentam gradualmente de lesão pré-malignas para carcinomas com alto grau de invasividade (ONDREY et al., 1999; BINDHU et al., 2006; MISHRA et al., 2006; SAWHNEY et al., 2007), o que sugere que a via do NF- κ B pode desempenhar um importante papel nos estágios iniciais da carcinogênese. Adicionalmente, o cross-talk (Figura 6.1) entre o NF- κ B e a via de sinalização da proteína STAT3 (signal transducer and activator of transcription) pode levar ao aumento ainda mais relevante do potencial proliferativo através da expressão de genes como c-myc e Ciclina D1 (REICH; LIU, 2006).

Figura 6.1 – Esquema do Cross-talk entre a via de sinalização da STAT3 e a proteína NF-κB (Adaptado de MOLINOLO et al. 2008)

Neste estudo, em relação ao padrão de expressão intracelular, avaliado pela técnica de Imunofluorescência, da proteína pAkt, as linhagens celulares cultivadas bidimensionalmente apresentaram positividade citoplasmática e nuclear, HN6 e HN30 (Figura 5.1 A, B), ou apenas nuclear, HN31 (Figura 5.1 C), porém em contato com o Matrigel®, apenas a linhagem celular HN6 exibiu mudança na expressão da proteína pAkt, que passou a ser predominantemente nuclear (Figura 5.1 D).

A literatura relata que, depois de ativada na membrana plasmática, a proteína pAkt pode ser translocada tanto para o citoplasma como para núcleo, podendo, assim, fosforilar diferentes tipos de substratos como, por exemplo, IKK α , encontrado no compartimento citoplasmático. Todavia, os substratos nucleares da pAkt ainda não foram totalmente elucidados (ANDJELKOVIC et al., 1997; MEIER et al., 1997; NICHOLSON; ANDERSON, 2002; FRESNO VARA et al., 2004). Contudo, segundo Cichy et al. (1998), pAkt nuclear pode estar envolvido com a expressão de *Insulin-like growth factor binding protein 1* (IGFBP1). Além disso, para Wang e Brattain (2006), a membrana plasmática não é o único lugar em que a proteína Akt pode ser ativada, além de presente, ela também pode ser iniciada no núcleo por mecanismos ainda não esclarecidos.

A técnica de Imunofluorescência revelou, inesperadamente, a localização citoplasmática do NF- κ B, independente do cultivo celular proposto, em todas as linhagens celulares analisadas (Figura 5.2 A, B, C, D, E, F). É importante salientar que o NF- κ B só tem função na transcrição de genes quando no núcleo, pois a sua localização citoplasmática significa que ele está sendo inativado pelo I κ B (CHANG et al., 2003; DOLCET et al., 2005). Contudo, não se pode afirmar a sua não participação na via de sinalização PI3K/Akt nas linhagens celulares estudadas, pois o tempo que o NF- κ B permanece no núcleo dessas células pode ser fugaz. Dessa forma, quando as linhagens celulares foram analisadas, o NF- κ B foi observado apenas no citoplasma. Por fim, neste trabalho, há indícios de atividade do NF- κ B detectada através dos resultados obtidos no Western Blotting, pois estes variaram em relação ao grupo controle (cultivo bidimensional), ou seja, se a via PI3K/Akt não estivesse influenciando o fator de transcrição NF- κ B, seus níveis, independente de qualquer tratamento aos quais as células fossem submetidas, não se alterariam.

Todavia, para se ter certeza de tal atividade, a técnica de Imunoprecipitação é sugerida para avaliar se o I κ B está ligado ao NF- κ B, inativado-o.

Uma redução significativa nos níveis de expressão das proteínas avaliadas foi notada em todas as linhagens celulares cultivadas em ambiente tridimensional ($p < 0.05$; Figura 5.4 B; Tabela 5.1), exceto, no caso da proteína pAkt, na linhagem celular HN30, que apresentou uma redução no nível de expressão dessa proteína, porém não estatisticamente significativa ($p > 0.05$; Figura 5.4 B; Tabela 5.1). Contudo, a proteína Ciclina D1, na linhagem celular HN6, mostrou um aumento significativo de seus níveis quando cultivada em contato com Matrigel[®] ($p < 0.05$; Figura 5.4 B; Tabela 5.1).

A mudança do método de cultivo bidimensional para o tridimensional provocou uma diminuição na expressão das proteínas pAkt e NF- κ B em todas as linhagens celulares estudadas. Assim, pode-se sugerir que o tempo proposto neste experimento para avaliação do cultivo tridimensional (72 horas) foi suficiente apenas para analisar as células no primeiro estágio de contato com o Matrigel[®], ou seja, a etapa adaptativa e de início de formação de colônias.

Segundo Guarino (2007), as células tumorais quando em um novo ambiente devem ser capazes de se adaptarem e crescerem em colônias para posterior invasão e metástase. Portanto, o Matrigel[®], deve estar iniciando a estimulação do crescimento celular para posterior etapa de transdiferenciação que algumas células sofrem para aquisição de um fenótipo mais invasivo, ou seja, TEM. Essa hipótese suporta a diminuição dos níveis de expressão das proteínas avaliadas neste estudo em ambiente tridimensional, pois como já citado anteriormente, o cultivo bidimensional fornece um conveniente e rápido resultado para análises bioquímicas,

mas não demonstra as propriedades encontradas no microambiente tecidual *in vivo* (SCHMEICHEL; BISSEL, 2003).

Além disso, como anteriormente descrito, a via de sinalização PI3K pode ser ativada pelo EGF e, segundo informações do fabricante, o Matrigel® apresenta níveis reduzidos de EGF. Essa afirmação também embasa a diminuição dos níveis de pAkt e NF-κB avaliados no cultivo tridimensional para as linhagens celulares HN30 e HN31. Todavia, esse resultado não era esperado para a linhagem celular HN6 que, segundo Cardinali et al. (1995), apresenta o receptor de EGF constitutivamente ativado. Contudo, sugere-se que, esse receptor ativado possa estar estimulando outras vias de sinalização como STAT3 (Figuras 6.1 e 6.2) e Ras/MAPK (*mitogen activated protein kinase*)/ERK(*extracellular signal-regulated kinases*) (Figura 6.2), o que explicaria esse achado.

Figura 6.2- Esquema da ativação de vias de sinalização pela estimulação do receptor de EGF. Além da PI3K/Akt, há também as vias: Ras/MAPK/ERK e STAT3 (Abcam – <http://www.abcam.com>)

O cultivo tridimensional pode também inibir a proliferação celular devido a ter em sua composição TGF- β (*transforming growth factor-beta*) (Figura 6.3).

Figura 6.3- Influência do inibidor TGF- β na progressão do ciclo celular (DONOVAN; SLINGERLAND, 2000)

Este fato, somado ao anteriormente proposto a respeito da etapa adaptativa das células ao Matrigel[®], explica a redução dos níveis de Ciclina D1 nas linhagens celulares HN30 e HN31 detectados pela técnica de Western Blot, pois na Imunofluorescência não se notou qualquer alteração de localização. Entretanto, na linhagem celular HN6 os níveis de Ciclina D1 aumentaram significativamente ($p < 0.05$, Figura 5.4 B; Tabela 5.1). Esse resultado apóia a afirmação sobre a ativação das vias de sinalização citadas acima, STAT3 (Figura 6.1 e 6.2) e Ras/MAPK/ERK (Figura 6.2), que estão relacionadas com o ciclo celular. Além disso, os níveis de pAkt detectados na linhagem celular HN6, cultivada em Matrigel[®], podem ter levado a fosforilação e inibição do GSK3, este por sua vez possibilitaria um aumento da quantidade de β -catenina no núcleo que causaria um futuro aumento nos níveis de Ciclina D1 (VIVANCO; SAWYERS, 2002).

Por fim, é interessante notar que as linhagens celulares HN30 e HN31, quando submetidas ao cultivo tridimensional, mostraram comportamentos semelhantes para as proteínas analisadas. Devido ao fato da HN31 (metastática) ser derivada da HN30 (CARDINALI et al., 1995), elas provavelmente exibem certo grau de similaridade genética. Este achado também sugere o motivo pelo qual os níveis de expressão das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1, em modelo de cultivo bidimensional, serem tão parecidos nas linhagens celulares HN30 e HN31, mostrando que após o estabelecimento do tumor metastático, em um sítio secundário, suas características permanecem análogas ao do tumor primário.

6.2 Ensaio de Invasão Celular

A alta taxa de mortalidade na maioria dos pacientes diagnosticados com câncer é devido à disseminação de células tumorais pelo organismo resistentes a terapias convencionais. Células metastáticas adquirem mudanças genéticas e epigenéticas que as tornam fenotipicamente mais agressivas. O aumento do potencial de motilidade e invasão são essenciais para a metástase (DEVITA; HELLMAN; ROSENBERG, 2001). Esse aumento está associado com: diminuição da adesão célula-célula, ou seja, inativação da caderina-E (VLEMINCKX et al., 1991; BIRCHMEIER; HULSKEN; BEHRENS, 1995; BOYER; VALLÉS; EDME, 2000), potencial proliferativo das células tumorais (BOYER; VALLÉS; EDME, 2000), degradação da MB e estroma pela superexpressão das metaloproteinases e collagenases (WOODHOUSE; CHUAQUI; LIOTTA, 1997; BOYER; VALLÉS; EDME,

2000), e aquisição de características morfológicas semelhantes à de fibroblastos (BOYER; VALLÉS; EDME, 2000). Essas alterações determinam o que se denomina de TEM e são resultado direto da supressão da expressão de genes epiteliais e da aquisição da expressão de genes mesenquimais (BIRCHMEIER; BIRCHMEIER; BRAND-SABERI, 1996; BOYER; VALLÉS; EDME, 2000).

Segundo Grille et al. (2003), a via de sinalização PI3K/Akt está diretamente ligada a TEM em linhagens celulares de CEB humano. A ativação da Akt nessas células induziu a TEM, caracterizada pela: diminuição da expressão de proteínas específicas de células epiteliais como, por exemplo, caderina-E e β -catenina, início da expressão da proteína vimentina, marcador mesenquimal, mudanças na morfologia celular, perda da polarização celular, diminuição da adesão célula-MEC e produção de metaloproteinases. Como resultado da TEM, observou-se um aumento da motilidade e invasão. Esses achados mostram a importância da compreensão a respeito da atividade da proteína Akt e sugerem como estratégia terapêutica a sua inibição para o controle da invasão e metástase de células tumorais.

Nesse contexto, este trabalho buscou avaliar a expressão das proteínas pAkt, NF- κ B e Ciclina D1 em linhagens de células derivadas de CECp humano submetidas ao processo de invasão *in vitro*. Assim, as células foram semeadas no compartimento superior da câmara de invasão recoberto por uma fina camada de Matrigel[®], como descrito no capítulo material e métodos, com o objetivo de mimetizar a MB. Apenas as células com maior potencial invasivo conseguiram ultrapassar o Matrigel[®] e os poros de 8 μ m, menores que o diâmetro celular, permanecendo aderidas na parte inferior da câmara de invasão.

As células com capacidade de invasão geraram linhagens invasivas denominadas de HN6.1, HN30.1 e HN31.1, e foram cultivadas mais quatro

passagens. Segundo Capuano (2005), a partir da quarta passagem, os aspectos imunofenotípicos e subcelulares das células tratadas tornam-se constantes e inalterados.

Os resultados obtidos pela técnica de Imunofluorescência mostraram diferenças no padrão de expressão intracelular, para a proteína pAkt, exclusivamente, nas linhagens celulares HN6 e HN30. Após as células terem sido submetidas ao ensaio de invasão, a linhagem celular HN30 passou a expressar pAkt predominantemente no compartimento nuclear (Figura 5.1 H) e a linhagem celular HN6 exibiu marcação citoplasmática e nuclear, sendo que a expressão citoplasmática apresentou-se em forma de rede (Figura 5.1 G).

Como explicado no item 6.1, a marcação intracelular da proteína pAkt pode variar entre citoplasma e núcleo. Contudo, vale ressaltar que, apenas a linhagem celular HN31, independente dos tratamentos propostos neste estudo, modelo de cultivo tridimensional e ensaio de invasão celular, apresentou essa proteína predominantemente presente no núcleo (Figura 5.1 C, F, I). Esse resultado diverge da afirmação feita por Meier e Hetnmings (1999), de que estímulos celulares prolongados por fatores de crescimento resultam na translocação de pAkt para o compartimento nuclear, pois a linhagem celular que apresenta o receptor de EGF constitutivamente ativado é a HN6 (CARDINALI et al., 1995) e esta exibiu pAkt também no citoplasma, como já apresentado anteriormente (Figura 5.1 A, G). Portanto, o significado da localização intracelular da proteína pAkt ainda não foi totalmente esclarecido.

Outro aspecto observado na Imunofluorescência para pAkt foi a marcação citoplasmática em forma de rede que a linhagem invasiva HN6.1 apresentou (Figura 5.1 G). Todavia, a literatura não confirma esse tipo de expressão, mas pode-se

sugerir que esteja associada ao citoesqueleto, pois essa proteína tem envolvimento na TEM, como já descrito (GRILLE et al., 2003).

No caso da proteína NF- κ B, as linhagens invasiva HN6.1 e HN30.1 apresentaram marcação tanto citoplasmática quanto nuclear (Figura 5.2 G, H). Com esse achado, pode-se afirmar, através da técnica de Imunofluorescência, a atividade do NF- κ B como fator de transcrição nuclear. Todavia, na linhagem invasiva HN31.1 (Figura 5.2 I) e mesmo no grupo controle, HN6, HN30 e HN31 (Figura 5,2 A, B, C), a positividade foi marcadamente citoplasmática, porém, como já explicado no item 6.1, sugere-se a ativação ou não da via PI3K/Akt/NF- κ B através da análise dos resultados obtidos pela técnica de Western Blot, abordados mais adiante.

Um aumento significativo nos níveis de expressão das proteínas pAkt e NF- κ B foi notado nas linhagens invasivas HN6.1 e HN30.1 ($p < 0.05$; Figura 5.5 B; Tabela 5.2). Contudo, no caso do clone invasivo HN31.1, observou-se aumento no nível de expressão da proteína pAkt e discreta diminuição de NF- κ B, porém ambos os valores não foram estatisticamente significantes ($p > 0.05$; Figura 5.5 B; Tabela 5.2). Já a proteína Ciclina D1 apresentou aumento dos seus níveis de expressão em todas as linhagens invasivas, sendo que apenas na HN6.1 foi estatisticamente significativo ($p < 0.05$; Figura 5.5 B; Tabela 5.2).

Assim, esse aumento significativo da proteína Akt nos clones invasivos HN6.1, HN30.1 e HN31.1, gerados a partir das linhagens celulares HN6, HN30 e HN31, confirma os achados já descritos por Grille et al. (2003), mostrando a importância da via de sinalização PI3K/Akt no processo de invasão dos CECP.

Os resultados apresentados também mostraram que nas linhagens invasivas HN6.1 e HN30.1, o fator de transcrição NF- κ B participa do processo de invasão tumoral. Nessas linhagens pode-se notar um aumento significativo dessa proteína

que segundo Huber et al. (2004), sua ativação também está relacionada com a TEM, pois o início do chamado programa mesenquimal, envolvendo genes como MMP2/9, VCAM-1, ICAM-1 e Catepsinas B e Z (BASSÈRES; BALDWIN, 2006), foi relatado como sendo dependente da ativação do NF- κ B em cânceres de mama e sua inibição parece estar relacionada com a reversão da TEM (HUBER et al., 2004).

Chua et al. (2007) demonstraram que a ativação de NF- κ B inibia a expressão de genes epiteliais específicos como caderina-E e desmoplaquina, além de induzir a expressão do gene mesenquimal vimentina em carcinomas de mama, corroborando com os achados de Julien et al. (2007) que afirmaram que ativação de NF- κ B pelo Akt aumenta a expressão Snail (fator de repressão da expressão de caderina-E) e, conseqüentemente, induz a TEM em células de CEB, além disso, esses autores relataram que apenas a expressão da subunidade p65 NF- κ B é suficiente para a indução da TEM.

Outro importante regulador da TEM é o fator de transcrição TWIST. Em 2007, Horikawa et al., sugeriram que NF- κ B poderia promover a TEM e metástase através da ativação do fator de transcrição TWIST.

Hong et al. (2009), em resumo, demonstraram que a inibição do Akt utilizando PIA (análogo de fosfatidilinositol) diminuiu a indução da expressão de Snail, TWIST e vimentina, aumentou a de caderina-E e β -catenina, e reduziu a motilidade celular, revertendo, dessa forma, a TEM em células de CEB (Figura 6.4). Essa reversão da TEM parece estar relacionada com a diminuição da ativação da via Akt/NF- κ B. Assim, esses autores acreditam que, uma estratégia envolvendo a inibição do Akt deverá ser uma ferramenta terapêutica no controle da invasão e metástase em pacientes diagnosticados com CEB.

Reversão da Transição Epitélio-Mesenquimal

Figura 6.4- Representação esquemática do mecanismo de sinalização proposto que promove a reversão da TEM através da inibição da proteína Akt em células de CEB (Adaptado de HONG et al., 2009)

Neste trabalho também se pode sugerir que na linhagem invasiva HN31.1, a via de sinalização Akt/NF-κB encontra-se inativada, pois a técnica de Imunofluorescência exibiu o fator de transcrição NF-κB no compartimento citoplasmático e o Western Blotting mostrou que os seus níveis de expressão sofreram uma alteração não estatisticamente significativa. Assim, como descrito por Larue e Bellacosa (2005), outras vias de sinalização, representadas na Figura 6.5, podem estar influenciando na TEM do clone invasivo HN31.1.

Figura 6.5- Representação esquemática das vias de sinalização associadas com a TEM no câncer (Adaptado de LARUE; BELLACOSA, 2005)

Por fim, neste estudo, observamos o aumento significativo do potencial proliferativo em todas as linhagens invasivas estudadas. Esse resultado já era esperado devido à via PI3K/Akt, como já demonstrado, estar ativada em todas as linhagens invasivas. Além disso, os maiores níveis de expressão da proteína Ciclina D1 nos clones invasivos HN6.1 e HN30.1 podem ser explicados pela possível

ativação, apresentada nesse trabalho, da via PI3K/Akt/NF- κ B nessas linhagens. Também, como esperado, a linhagem invasiva HN6.1 exibiu maior expressão de Ciclina D1 por apresentar o receptor de EGF constitutivamente ativado (CARDINALI et al., 1995) que, além da via PI3K/Akt, pode estar ativando outras vias como da Ras/MAPK/ERK e STAT3, ambas relacionadas com a proliferação celular (Figuras 6.1, 6.2 e 6.3).

Inibidores do ciclo celular ($p21^{CIP1/WAF1}$ e $p27^{KIP1}$) e GSK3 são alguns dos alvos da proteína Akt envolvidos na progressão do ciclo celular (BLUME-JENSEN; HUNTER, 2001).

A inibição da atividade catalítica de GSK3 pela proteína Akt inibe a fosforilação da proteína β -catenina impedindo, dessa forma, a sua degradação e permitindo a sua translocação para o núcleo onde se liga a diferentes fatores de transcrição, como TCF/LEF-1, induzindo a expressão de vários genes, como, por exemplo, o da Ciclina D1, que induz a progressão do ciclo celular (FRESNO VARA et al., 2004). Além disso, a quantidade de Ciclina D1 também é regulada pela ação da GSK3, segundo Diehl et al. (1998), GSK3 fosforila a Ciclina D1 no sítio Thr-286 levando a sua degradação e assim estabilização de seus níveis.

A proteína Akt também é responsável pela fosforilação das proteínas p21 e p27, retendo-as, assim, no citoplasma e inibindo seus efeitos antiproliferativos já descritos previamente (ZHOU et al., 2001; LIANG et al., 2002; SHIN et al., 2002; VIGLIETTO et al., 2002).

O NF- κ B está também relacionado com o ciclo celular. Segundo Hinz et al. (1999), a ativação de NF- κ B induz a sua translocação do citoplasma para o núcleo onde atua como fator de transcrição de genes como, Ciclina D1. Nesse trabalho, os autores mostram que a inibição do NF- κ B causa uma pronunciada redução da

atividade da Ciclina D1, resultando em um atraso na fosforilação da proteína do Rb. Portanto, NF- κ B contribui para a progressão do ciclo celular e sugere-se que um dos seus alvos seja a proteína Ciclina D1.

7 CONCLUSÕES

Nas linhagens celulares avaliadas, quando cultivadas em ambiente tridimensional, a significativa redução dos níveis de expressão de proteínas da via de sinalização PI3K ocorreu devido a uma possível fase adaptativa dessas células ao Matrigel[®] que seria seguida provavelmente por uma etapa de aumento do potencial proliferativo e posterior transdiferenciação de algumas células para ganho de fenótipo mais agressivo. Portanto, mostrando a influência do microambiente na progressão do CECP.

Além disso, este estudo mostrou a participação da via de sinalização Akt/NF- κ B/Ciclina D1 no processo de invasão dos clones invasivos HN6.1 e HN30.1 derivados das linhagens celulares HN6 e HN30 de CECP.

REFERÊNCIAS¹

Abcam - Esquema da ativação de vias de sinalização pela estimulação do receptor de EGF. Disponível em: URL:<http://www.abcam.com> [Data de acesso: 23/04/2009].

Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004;6(3):203-8.

Alberts B, Bray B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3^a. ed. New York: Garland Publishing; 1994.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(7):3983-8.

Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, Benavides F, Conti CJ, Sauk J, et al. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res* 2004;10(12Pt 1):4029-37.

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

Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-83.

Bassères DS, Baldwin AS. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 2006; 25(51):6817-30.

Bindhu OS, Ramadas K, Sebastian P, Pillai MR. High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2006;28(10):916-25.

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

Biocarta - Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt. Disponível em: URL: <http://www.biocarta.com> [Data de acesso: 23/04/2009].

Biosciences - Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt/NF- κ B. Disponível em: URL: http://www.emdbiosciences.com/popup/cbc/NFKB_Interactive_Pathway.htm [Data de acesso: 23/04/2009].

Birchmeier C, Birchmeier W, Brand-Saberi B. Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Acta Anat* 1996;156(3):217-26.

Birchmeier W, Hülken J, Behrens J. E-cadherin as an invasion suppressor. *Ciba Found Symp*. 1995;189:124-36.

Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001;1(1):46-54.

Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411(6835):355-65.

BMG Labtech - Representação da câmara bipartida separada por filtro de policarbonato de 8 μ m de diâmetro. Disponível em: URL: <http://www.bmglabtech.com/application-notes/fluorescence-intensity/fluoroblock-fluostar-144.cfm> [Data de acesso: 23/04/2009].

Borgatti P, Martelli AM, Bellacosa A, Casto R, Massari , Capitani S, et al. Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MCT3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. *FEBS Lett* 2000;477(1-2):27-32.

Boudreau N, Bissel MJ. Extracellular matrix signaling: interaction of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(5):640-6.

Boyer B, Vallés AM, Edme N. Induction and regulation of epithelial mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol* 2000;60(8):1091–9.

Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 2004;33(6):317–22.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell

survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96(6):857-68.

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

Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1994;74(1):152-8.

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

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

Capuano ACT. Estudo da expressão das proteínas PTEN e Akt em células derivadas de carcinoma epidermóide bucal em câmara de invasão [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

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

Carlin B, Jaffe R, Bender B, Chung AE. Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J Biol Chem* 1981;256(10):5209-14.

Carlsen H, Alexander G, Austenaa LM, Ebihara K, Blomhoff R. Molecular imaging of the transcription factor NF- κ B, a primary regulator of stress response. *Mutat Res* 2004;551(1-2):199-211.

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

Casiglia J, Woo SB. A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent* 2001;49(1):72-82.

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

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

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

Chen Q, Luo G, Li B, Samaranayake LP. Expression of p16 and CDK4 in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: a semi-quantitative immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 1999;28(4):158-64.

Christofori, G. New signals from the invasive front. *Nature* 2006; 441(7092):444–50.

Chua HL, Bhat-Nakshatri P, Clare SE, Morimiya A, Badve S, Nakshatri H. NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 2007;26(5):711-24.

Chung AE, Jaffe R, Freeman JL, Vergness JP, Broginski KE, Carlin B. Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line. *Cell* 1979;16(2):277-87.

Cichy SB, Uddin S, Danilkovich A, Guo S, Klippel A, Unterman TG. Protein kinase /Akt mediates effects of insulin on hepatic insulin-like growth factor-binding protein- 1 gene expression through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem* 1998;273(11):6482-7.

Clarkson R. Ikb kinase alpha: a link in the chain of the mammary cycle. *Breast Cancer Res* 2002;4(5):173-5.

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

Conway DI, Petticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LM. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-

analysis of case-control studies. *Int J Cancer* 2008;122(12):2811-9.

Cotran RS, Robbins SL, Kumar V, Schoen FJ. *Robbin pathologic basis of disease*. 5^a. ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1994.

Crowe DL, Hacia JG, Hsieh CL, Sinha UK, Rice H. Molecular pathology of head and neck cancer. *Histol Histopathol* 2002;17(3):909-14.

Cruz IB, Snijders PJ, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has a predictive value for developing oral cell carcinoma. *J Pathol* 1998;184(4):360-8.

Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006;6(3):184–92.

Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* 2009;21(3):194-200.

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

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

Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* 2003;30(3):256-68.

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 6^a. ed. New York: Lippincott-Raven; 2001.

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998;12(22):3499–511.

Diehl JA. Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther* 2002;1(3):226-31.

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

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

Donovan J, Slingerland J. Transforming growth factor-beta and breast cancer: Cell cycle arrest by transforming growth factor-beta and its disruption in cancer. *Breast Cancer Res* 2000;2(2):116–24.

Dufner A, Andjelkovi M, Burgering BM, Hemmings BA, Thomas G. Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1999;19(6):4525-34.

el-Naggar AK, Steck K, Batsakis JG. Heterogeneity of the proliferative fraction and cyclin D1/CCND1 gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Cytometry* 1995;21(1):47-51.

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

Feig LA. The many roads that leads to Ras. *Science* 1993;260(5109):767-8.

Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 1990;50(19):6130-8.

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

Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004;23(18):3151–71.

Forti FL. Clonagem do Receptor de ACTH de células adrenocorticais Y-1 de

camundongo e expressão em fibroblastos 3T3 e células de AR-1 para elucidação de vias de transdução de sinal [Tese de Doutorado]. São Paulo: Instituto de Química da USP; 2001.

Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Muñoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol* 2000;36(1):106-15.

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

Glezer I, Marcourakis T, Werneck-Avellar MC, Gorenstein C, Scavone C. The role of the transcription factor NF- κ B in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. *Rev Bras Psiquiatr* 2000;22(1):26-30.

Goodger NM, Gannon J, Hunt T, Morgan PR. Cell cycle regulation proteins – an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncol* 1997;33(2):61-73.

Gottwald E, Giselbrecht S, Augspurger C, Lahni B, Dambrowsky N, Truckenmuller R, et al. A chip-based platform for the in vitro generation of tissues in three-dimensional organization. *Lab Chip* 2007;7(6):777–85.

Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(3):211–24.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, et al. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 2003;63(9):2172-8.

Guarino M. Epithelial–mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(12):2153-60.

Hall M, Bates S, Peters G. Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. *Oncogene* 1995;11(8):1581-8.

Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/Akt - a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2004;1697(1-2):3-16.

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

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/Akt pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discovery* 2005;4(12):988-1004.

Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 1999;19(4):2690-8.

Hong KO, Kim JH, Hong JS, Yoon HJ, Lee JI, Hong SP, et al. Inhibition of Akt activity induces the mesenchymal-to-epithelial reverting transition with restoring E-cadherin expression in KB and KOSCC-25B oral squamous cell carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28:28.

Horikawa T, Yang J, Kondo S, Yoshizaki T, Joab I, Furukawa M, et al. Twist and epithelial–mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2007;67(5):1970-8.

Houghton J, Morozov A, Smirnova I, Wang TC. Stem cells and cancer. *Semin Cancer Biol* 2007;17(3):191-203.

Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, et al. NF-kappaB is essential for epithelial–mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2004; 114(4):569-81.

INCA - Instituto Nacional do Câncer 2009. Disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br> [Data de acesso: 23/04/2009].

Jacks T, Weinberg RA. The expanding role of cell cycle regulators. *Science* 1998;280(5366):1035-6.

Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, et al. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 1995;376(6538):313-20.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58(2):71–96.

Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG. NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12(1):73-90.

Joyce D, Bouzahzah B, Fu M, Albanese C, D'Amico M, Steer J, et al. Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* 1999;274(36):25245-9.

Julien S, Puig I, Caretti E, Bonaventure J, Nelles L, van Roy F, et al. Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene* 2007, 26(53):7445-56.

Junquera LC, Carnero J. *Biologia Celular e Molecular*. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Kanwar YS, Farquhar MG. Isolation of glycosaminoglycans (heparan sulfate) from glomerular basement membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76(9):4493-7.

Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005;5(10):749-59.

Kefalides NA. Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int Rev Connect Tissue Res* 1973;6:63-104.

Khwaja A. Akt is more than just a Bad kinase. *Nature* 1999;401(6748):33-4.

Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, et al. Basement membrane complexes with biological activity, *Biochemistry* 1986; 25(2):312-8.

Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 1982;21(24):6188-93.

Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res* 2004;10(16):5455-63.

Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in

health and disease. *J Mol Med* 2004;82(7):434-48.

Kuo MY, Lin CY, Hahn LJ, Cheng SJ, Chiang CP. Expression of cyclin D1 is correlated with poor prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1999;28(4):165-9.

Larue L, Bellacosa A. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/Akt pathways. *Oncogene* 2005;24(50):7443-54.

Lebleu V, MacDonald B, Kalluri R. Structure and Function of Basement Membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232(9):1121–9.

Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; 21:605-31.

Li X, Stark GR. NF-kappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 2002;30(4):285-96.

Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2003;2(4):339-45.

Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002;8(10):1153-60.

Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37(5):401-18.

Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K/Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 2003;4(4):257-62.

Martin JL, Baxter RC. Expression of insulin-like growth factor binding protein-2 by MCF-7 breast cancer cells is regulated through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway. *Endocrinology* 2007; 148(5):2532-41.

Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, el-Naggar AK, Lo Muzio L, Staibano S, et al. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer*

2005;104(11):2430-6.

Masuda M, Hirakawa N, Nakashima T, Kuratomi Y, Komiyama S. Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. *Cancer* 1996;178(3):390-5.

Mate JL, Ariza A, Aracil C, López D, Isamat M, Pérez-Piteira J, et al. Cyclin D1 overexpression in non-small cell lung carcinoma: correlation with Ki67 labelling index and poor cytoplasmic differentiation. *J Pathol* 1996;180(4):395-9.

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27Kip1. *Nature* 2000;404(6779):782-7.

Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B β . *J Biol Chem* 1997;272(48):30491-7.

Meier R, Hemmings BA. Regulation of protein kinase B. *J Recept Signal Transduct Res* 1999;19(1-4):121-8.

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

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(6):622-35.

Mishra A, Bharti AC, Varghese P, Saluja D, Das BC. Differential expression and activation of NF-kappaB family proteins during oral carcinogenesis: role of high risk human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 2006;119(12):2840-50.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 2008;18:Epub ahead of print.

Molinolo AA, Hewitt SM, Amornphimoltham P, Keelawat S, Rangdaeng S, Meneses García A, et al. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clin Cancer Res* 2007;13(17):4964-73.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* 1995;374(6518):131-4.

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

Motokura T, Arnold A. Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3(1):5-10.

Murray AW, Hunt T. The cell cycle: an introduction. Illustrated Edition. New York: Oxf Univ Press; 1993.

Nelson CM, Bissell MJ. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin Cancer Biol.* 2005;15(5):342-52.

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

OMS - Organização Mundial de Saúde. Disponível em: URL: <http://www.who.int> [Data de acesso: 23/04/2009].

Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Cowl-Bancroft CV, et al. Constitutive activation of transcription factors NF-(kappa)B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog* 1999;26(2):119-29.

Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, et al. Frequent genetic and biochemical of the PI3-K/Akt/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2005;114(2):242-8.

Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(1):49-62.

Perkins ND. NF-kappaB: tumor promoter or supressor? *Trends Cell Biol* 2004;14(2):64-9.

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

Ponder BA. Cancer genetics. *Nature* 2001;411(6835):336-41.

Ramirez F, Rifkin DB. Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol* 2003;22(2):101-7.

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

Reich NC, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 2006;6(8):602-12.

Representação esquemática da iniciação tumoral a partir de células diferenciadas. Disponível em: URL: http://evunix.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2001/Imuno01_desord_linfo.htm [Data de acesso: 23/04/2009].

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

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005;307(5712):1098-101.

Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, Shishodia S, Sethi G, Gupta SD, et al. Expression of NF-kappaB parallels COX-2 expression in oral precancer and cancer: association with smokeless tobacco. *Int J Cancer* 2007;120(12):2545-56.

Schmeichel KL, Bissell MJ. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci* 2003;116(12):2377-88.

Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006;441(7092):424-30.

Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002;8(10):1145-52.

Shin KY, Kong G, Kim WS, Lee TY, Woo YN, Lee JD. Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancers. *Br J Cancer* 1997;75(12):1788-92.

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

Sodunke TR, Turner KK, Caldwell SA, McBride KW, Reginato MJ, Noh HM. Micropatterns of Matrigel for three-dimensional epithelial cultures. *Biomaterials* 2007;28(27):4006-16.

Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993;7(15):1434-41.

Sturgis EM, Wei Q, Spitz MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 2004;31(6):726-33.

Tarquinio SBC. Estudo de componentes da Matriz Extracelular no líquen Plano, Penfigóide benigno da mucosa e Pênfigo Vulgar [Tese de Doutorado Bucal]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

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

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

Timpl R, Dziadek M, Fujiwara S, Nowack H, Wick G. Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein. *Eur J Biochem* 1983;137(3):455-65.

Todd R, Donoff RB, Wong DT. The molecular biology of carcinogenesis: toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofacial Surg* 1997;55(6):613-23.

Toh YC, Zhang C, Zhang J, Khong Y M, Chang S, Samper VD, et al. A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels. *Lab Chip* 2007;7(3):302–9.

Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro K, Kimura-Yanagawa T, Hino S, et al. Role of HGF/c-met system in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma cells in vitro and its clinical significance. *Int J Cancer* 2001;93(4):489-96.

Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, et al. Cytoplasmic

relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002;8(10):1136-44.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2(7):489-501.

Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991;66(1):107-19.

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

Wang R, Xu J, Juliette L, Castilleja A, Love J, Sung SY, et al. Three-dimensional co-culture models to study prostate cancer growth, progression, and metastasis to bone. *Semin Cancer Biol* 2005;15(5):353-64.

Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 1997;80(8):1529-37.

Wright JM. A review and update of oral precancerous lesions. *Texas Dent J* 1998;115(6):15-9.

Yurchenco PD, O'Rear JJ. Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(5):674-81.

Zhang M, Fang X, Liu H, Guo R, Wu X, Li B, et al. Bioinformatics-based discovery and characterization of an Akt-selective inhibitor 9-chloro-2-methylellipticinium acetate (CMEP) in breast cancer cells. *Cancer Lett* 2007;252(2):244-58.

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

ANEXO A- Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa**

DECLARAÇÃO
Protocolo 187/06

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a alteração do título do projeto "Análise da expressão das proteínas AKT, NF-kB, mTOR & ciclina D1 em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em ambiente tridimensional e câmara de invasão" para "**Análise da expressão das proteínas AKT, NF-kB & ciclina D1 em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em ambiente tridimensional e câmara de invasão**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Fernanda Salgueiredo Giudice, sob orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Décio Santos Pinto Junior.

São Paulo, 16 de dezembro de 2008.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador CEP/FOUSP