

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FLÁVIA SAYURI MATSUO

ESTUDO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K-Akt E GSK3 β EM
CARCINOMAS EPIDERMOIDES METASTÁTICOS E NÃO
METASTÁTICOS DE CAVIDADE BUCAL

UBERLÂNDIA

2015

FLÁVIA SAYURI MATSUO

**ESTUDO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K-Akt E GSK3 β EM
CARCINOMAS EPIDERMOIDES METASTÁTICOS E NÃO
METASTÁTICOS DE CAVIDADE BUCAL**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M434e

2015

Matsuo, Flávia Sayuri, 1989-

Estudo da via de sinalização PI3K-Akt E GSK3 β em carcinomas epidermoides metastáticos e não metastáticos de cavidade bucal / Flávia Sayuri Matsuo. - 2015.

81 p. : il.

Orientador: Paulo Rogério de Faria.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Boca - Câncer - Teses. 3. Imunohistoquímica - Teses. 4. Metástase - Teses. I. Faria, Paulo Rogério de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 581

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Uberlândia,

instituição que proporcionou minha graduação e pós-graduação e o contato com professores brilhantes que inspiraram minha carreira acadêmica e mostraram o caminho da pesquisa científica e que através do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) e da Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas (PPGBC) possibilitaram a realização desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),

que proporcionou através do apoio financeiro as condições materiais necessárias para realização desse trabalho.

Ao A.C. Camargo Cancer Center,

que através do Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, diretor do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo, gentilmente possibilitou nosso acesso ao *core facilite* para a construção do TMA e ao analista de pesquisa Carlos Ferreira Nascimento, que cedeu seu tempo para a confecção do TMA e com muito entusiasmo compartilhou seu conhecimento sobre a técnica, com dicas de montagem para que pudéssemos adaptá-la ao uso no laboratório de patologia bucal da UFU. Essa ajuda possibilitou o andamento muito mais rápido desse trabalho.

Ao prof. Dr. Paulo Rogério de Faria,

por todo conhecimento compartilhado desde a iniciação científica, foram aproximadamente quatro anos de orientação, os quais sinto-me satisfeita pela confiança depositada, pela autonomia cedida tanto em relação aos experimentos como nas decisões que foram tomadas durante todo esse trabalho. Agradeço imensamente pela oportunidade oferecida que certamente contribuiu para meu desenvolvimento científico, por poder aprender muitas técnicas, ter acesso a diferentes laboratórios e a possibilidade de escrever artigos científicos, isso tudo influenciou na minha certeza sobre o futuro na carreira acadêmica e na pesquisa científica.

Ao prof. Dr. Adriano Mota Loyola,

que considero uma grande fonte de admiração e inspiração, foi a primeira pessoa a dar-me a oportunidade de trabalhar no laboratório e a confiar no meu esforço como IC, agradeço muito não só pela participação ativa nesse trabalho mas também pelos conhecimentos compartilhados, conselhos dados e pela confiança depositada.

Ao prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva,

que foi responsável por orientar toda a parte de PCR em tempo real, agradeço muito pela disposição em ensinar todos os passos detalhados do experimento, pela liberdade fornecida em seu laboratório e por todo conhecimento compartilhado, gostei muito da forma como conduziu a orientação, que mesmo por pouco tempo foi fundamental para que eu pudesse amadurecer minha prática laboratorial e reforçar ainda mais meu gosto pela pesquisa.

A profa. Dra. Daniele Lisboa Ribeiro,

que também é uma inspiração como professora e pessoa. Tirou dúvidas quanto ao trabalho, auxiliou e sempre se mostrou disposta em ajudar, tanto é que cedeu uma alíquota de um dos anticorpos que foi utilizado para a realização desse trabalho.

Ao Laboratório de Patologia Bucal e de Reprodução

e todos seus integrantes, incluindo as técnicas Ângela e Lúbia, que sempre mostraram-se muito prestativas em todos os serviços solicitados. Ao João Paulo que sempre esteve disposto em ajudar, esclarecer e ensinar; a Marília companheira de trabalho; a Gabriela, Roberta, Silas, Luiz Fernando, Leana, Kamilla e muitos outros alunos do laboratório de patologia bucal pela ajuda fornecida ou mesmo pela companhia, amenizando o cansaço dos experimentos diários. Aos integrantes do laboratório de reprodução Talita, Nádia, Felipe, Daniele, Bruna, Bruninha, Mari e Sara por me integrar tão bem ao laboratório de Reprodução, pela companhia e pelos ensinamentos compartilhados.

Outros laboratórios,

aos laboratórios de imunologia, genética e histologia que contribuíram com a estrutura necessária para que o trabalho pudesse ser realizado.

A minha família,

principalmente aos meus pais Célia e Nelson que sempre apoiaram meus estudos, mesmo estando longe durante toda a graduação e pós-graduação, agradeço muito pela paciência, compreensão e a confiança depositada. A minha irmã Priscila que sempre foi minha companheira em todos os momentos. E ao meu namorado Renato pelo companheirismo, paciência, compreensão e por todo apoio dado nesse período.

Aos grandes amigos,

principalmente Raquel e Tafarel, que por vezes, me auxiliaram nesse trabalho, inclusive durante a noite. Aos grandes amigos Nathane, Edigar, Ana Flávia, Mateus, Tamires e toda a 3ª turma de biomedicina e outros amigos que não foram citados, mas que de uma maneira indireta, com palavras de incentivo ou somente pela companhia também ajudaram, fazendo com que esse trabalho fosse desenvolvido de uma forma mais amena e prazerosa, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O carcinoma epidermoide bucal (CEB) representa mais de 90% das neoplasias malignas que acometem essa região. Na maioria dos casos o diagnóstico é realizado em estágio avançado e, portanto o paciente apresenta-se com um prognóstico ruim. Assim, estudos com proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular têm sido amplamente investigadas como futuros biomarcadores de diagnóstico e prognóstico. Nesse contexto, a via PI3K-Akt parece estar associada com o desenvolvimento de muitos tumores, inclusive o CEB. A proteína chave dessa via é Akt, proteína serina/treonina quinase multifuncional regulada através da via PI3K. Uma vez fosforilada, ela é capaz de regular múltiplos substratos que podem desencadear alterações metabólicas e ativar o crescimento, proliferação e sobrevida celular. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo investigar, por imuno-histoquímica, a expressão de Akt total, pAKT1-Thr308, pAKT-Ser473, GSK3 β , pGSK3 β -Ser9 e pmTOR2448 em 106 pacientes, sendo 16 controles e 90 pacientes com CEB e avaliou a associação delas com fatores clinicopatológicos. Além disso, estudou-se a expressão relativa dos genes *Akt1/2/3*, *PIK3CA*, *mTOR* e *GSK3 β* em 23 pacientes, sendo 7 controles e 16 tumores. Todos os casos de CEB empregados no estudo foram confirmados histologicamente e divididos em dois grupos: primários não metastáticos (PNM) e metastáticos (PM). Os dados sociodemográficos e clinicopatológicos de cada paciente foram obtidos a partir da revisão dos prontuários médicos utilizando um questionário semiestruturado. Para estudo imuno-histoquímico, utilizou-se a técnica de TMA (*Tissue Microarray*) e o método estreptavidina-biotina-peroxidase para a revelação das proteínas. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. Os principais achados desse estudo foram que a expressão imuno-histoquímica das proteínas GSK3 β , pGSK3 β -Ser9, AKT total e pmTOR2448 foram显著mente maiores no grupo de CEB comparado ao grupo controle, sugerindo que essas proteínas podem estar relacionadas com o desenvolvimento e progressão do CEB. Além disso, a expressão das proteínas AKT total, pAKT1-Thr308, pAKT-Ser473, GSK3 β e pGSK3 β -Ser9 foram associadas com os fatores clinicopatológicos sexo, história familiar de câncer, localização, graduação histológica e metástases. A proteína GSK3 β teve destaque com maior expressão no grupo PM, sugerindo ser um indicador de progressão em pacientes com CEB. Além disso, a sua expressão esteve significantemente associada com vários fatores clinicopatológicos. Através da análise de correlação, pode-se observar correlação positiva e significante entre as proteínas investigadas, isso sugere que a via de sinalização PI3K-Akt está ativa na amostra de CEB estudada. Contrário aos resultados de imuno-histoquímica, a expressão relativa dos genes foi maior no grupo controle, exceto para os genes *AKT3* e *GSK3 β* , mas nenhuma diferença foi observada. A expressão relativa do gene *mTOR* foi estatisticamente maior no grupo controle, quando comparado aos grupos PNM e PM, o que mostra que a via mTOR é muito complexa e mais estudos são necessários para elucidar o seu papel no desenvolvimento progressão de CEB. Em conclusão, esses resultados indicam a possível ativação da via PI3K-Akt na progressão do CEB, com destaque para a proteína GSK3 β como um possível biomarcador prognóstico, especialmente na predição de metástase.

Palavras-chave: Carcinoma Epidermoide. Cavidade Bucal. Real Time PCR. Imuno-histoquímica. Via de Sinalização PI3K-Akt. Prognóstico. Metástase.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) represents more than 90% of all malignant neoplasms that affects these region. In most cases the diagnosis is detected in an advanced stage, hence the patient has a poor prognosis. Thus, studies with proteins that are involved in signaling pathways have been widely investigated as possible new therapeutic targets to aid the early diagnosis and prognosis. The PI3K-Akt signaling pathway has been prominent in the development of many types of tumors, including OSCC. One of the target proteins of this pathway is Akt, a serine/threonine protein kinase that is regulated by PI3K. Once phosphorylated, Akt is able to regulate multiple substrates causing metabolic disorders and activating cellular growth and proliferation. Therefore, this study aimed to investigate by immunohistochemistry the expression of Akt total, pAKT1-Thr308, pAKT-Ser473, GSK3 β , pGSK3 β -Ser9 e pmTOR2448 in 106 patients, being 16 controls and 90 OSCC patients, and their clinic-pathologic factors association. Additionally, this study also investigated *Akt1/2/3*, *PIK3CA*, *mTOR* e *GSK3 β* gene expression in 23 patients, being 7 controls and 16 OSCC patients. All OSCC diagnoses were histologically confirmed and splitted in two groups: non-metastasizing (PNM) and metastasizing primary tumors (PM). The social and clinic-pathologic data were retrieved from each patient's medical files by using a semi-structured questionnaire. For immunohistochemistry proposal, it was performed a TMA technique and all proteins was revealed by the streptavidin-biotin peroxidase method. For gene expression, it was used the real time PCR approach. The immunohistochemical results showed that GSK3 β , pGSK3 β -Ser9, AKT total and pmTOR2448 proteins were more expressed in the OSCC group than the control one, suggesting these proteins can be related to OSCC development and progression. Furthermore, AKT total, pAKT1-Thr308, pAKT-Ser473, GSK3 β and pGSK3 β -Ser9 expression were related to the clinic-pathologic factors, including sex, family cancer history, localization, histological grade and metastasis. The GSK3 β protein expression was higher in metastatic patients, therefore indicating to have a biomarker role in OSCC progression and metastasis. The correlation analysis showed significant positive correlation among investigated proteins, which means PI3K-Akt signaling pathway-driven OSCC development. The relative expression of all investigated genes was higher in the control group, except for *AKT3* and *GSK3 β* , but no significant differences was observed. The *mTOR* gene expression was significantly higher in the control group when compared to PNM and PM groups, suggesting such pathway to be somewhat complex and the necessity of further studies to elucidate its role in OSCC development and progression. In conclusion, these results indicate an activation of the PI3K-Akt signaling pathway in our OSCC sample and highlight a pivotal role for GSK3 β protein as a prognostic biomarker and predictor of metastasis.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma. Oral Cavity. Real Time PCR. Immunohistochemistry. PI3K-Akt Signaling Pathway. Prognosis. Metastasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Fotografias de pacientes com CEB em estágio avançado	16
FIGURA 2	Cortes histológicos corados em H&E	17
FIGURA 3	Ilustração esquemática das três isoformas da proteína Akt (Akt1, Akt2 e Akt3)	21
FIGURA 4	Ilustração esquemática resumida do mecanismo da via de sinalização PI3K-Akt	26
FIGURA 5	Distribuição da casuística nos grupos de CEB e controle para as amostras parafinadas e congeladas	30
FIGURA 6	Princípio básico da técnica para a construção de matrizes teciduais (TMA)	32
FIGURA 7	Mapa do TMA mostrando a posição de cada caso na lâmina	33
FIGURA 8	Curvas de Kaplan-Meier para tempo de sobrevida de 5 anos dos 90 pacientes com CEB	42
FIGURA 9	Expressão imuno-histoquímica de cada proteína em relação aos grupos controles e o grupo de CEB	44
FIGURA 10	Controles constituídos de epitélio normal corados em H&E e as respectivas reações imuno-histoquímicas	45
FIGURA 11	Expressão imuno-histoquímica das proteínas em relação aos grupos controle, PNM e PM	50
FIGURA 12	Reação imuno-histoquímica dos casos do grupo PNM e suas respectivas colorações em H&E	51
FIGURA 13	Reação imuno-histoquímica dos casos do grupo PM e suas respectivas colorações em H&E	52
FIGURA 14	Análise de correlação entre as proteínas estudadas	53
FIGURA 15	Expressão relativa dos genes <i>PIK3CA</i> , <i>AKT1</i> , <i>AKT3</i> , <i>mTOR</i> e <i>GSK3β</i> nos grupos controle e CEB	56
FIGURA 16	Expressão relativa dos genes <i>PIK3CA</i> , <i>AKT1</i> , <i>AKT3</i> , <i>mTOR</i> e <i>GSK3β</i> nos grupos controle, PNM e PM	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Estadiamento clínico segundo os critérios estabelecidos pela <i>Union Internationale Contre le Cancer</i> (UICC) e da <i>American Committee on Cancer</i> (AJCC)	30
TABELA 2	Especificações dos anticorpos usados de acordo com as respectivas diluições padronizadas, controles positivos empregados e referência.	33
TABELA 3	Distribuição dos <i>scores</i> conforme a porcentagem e intensidade de células marcadas.	35
TABELA 4	Sequência dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> com suas respectivas referências.	35
TABELA 5	Distribuição dos 90 pacientes com CEB quanto aos dados clinicopatológicos.	40
TABELA 6	Expressão das proteínas e a associação delas com as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas dos 90 pacientes com CEB.	46
TABELA 7	Expressão imunohistoquímica das proteínas em relação aos dados clinicopatológicos entre os grupos PNM e PM.	53
TABELA 8	Expressão imunohistoquímica das proteínas em relação aos dados clinicopatológicos entre os grupos PNM e PM.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	<i>Murine thymoma viral oncogene</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BAD	<i>Bcl2-associated agonist of cell death</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
Bcl-X_L	<i>B cell-lymphoma-extra large</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CDH1	<i>Cadherin 1</i>
CK1	<i>Casein kinase 1</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EMT	<i>Epithelial Mesenchymal Transition</i>
4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
Fas	<i>Fas-Ligand</i>
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GLUT4	<i>Solute carrier family 2, member 4</i>
GPCRs	<i>G-protein-coupled receptors</i>
GSK3β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HIF-1α	<i>Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit</i>
IGF1	<i>Insulin-like growth fator 1</i>
IRS1/2	<i>Insulin receptor substrates1/2</i>
JUN	<i>V-Jun sarcoma vírus 17 oncogene homolog</i>
LST8/GβL	<i>Lethal with sec thirteen 8/G protein β subunit-like</i>
MMP	<i>Matrix Metallopeptidase</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>Mechanistic target of rapamycin, complex 1</i>
mTORC2	<i>Mechanistic target of rapamycin, complex 2</i>
MYC	<i>V-myc avian myelocytomatosis oncogene homolog</i>
NFκB	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
Pdk1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PH	<i>Pleckstrin-homology domain</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIKK	<i>Phosphatidylinositol kinase-related kinase</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RAPTOR	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
Rheb	<i>Ras homologue enriched in brain</i>
RICTOR	<i>Rapamycin insensitive component of mTOR</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinases</i>
S6K1	<i>Ribosomal protein S6 kinase1</i>

Ser	Serina
Snail	<i>Snail family zinc finger</i>
TCF/LEF	<i>T-cell receptor/lymphoid enhancer factor</i>
TOR	<i>Target of rapamycin</i>
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
TSC1/2	<i>Tuberous sclerosis complex 1/2</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
β-TrCP	<i>Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Carcinoma Epidermoide Bucal	14
2.2 Via de Sinalização PI3K-Akt	18
2.3 Estrutura e função de PI3K, Akt, mTOR e GSK3 β	19
2.3.1 PI3K	19
2.3.2 AKT.....	21
2.3.3 mTOR.....	23
2.3.4 GSK3 β	24
2.4 A via de sinalização PI3K-Akt em CEB	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 Geral.....	28
3.2 Específicos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Casuística	29
4.2 Tissue Microarray (TMA)	31
4.3 Ensaio imuno-histoquímico.....	34
4.3.1 Avaliação da imuno-histoquímica.....	35
4.4 Real Time PCR	36
4.4.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers).....	36
4.4.1 Extração de RNA	37
4.4.2 Transcrição reversa	38
4.4.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real – Real Time PCR	38
4.5 Estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Dados clinicopatológicos gerais.....	40
5.2 Análise de sobrevida	42
5.3 Análise imuno-histoquímica	43
5.3.1 Análise geral da expressão das proteínas nos CEBs e grupo controle	43
5.3.3 Expressão das proteínas entre os grupos PNM, PM e grupo controle.....	49
5.3.4 Correlação geral entre as proteínas estudadas	53
5.4 Expressão gênica	55
6 DISCUSSÃO	58

7 CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética.....	75
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	77
ANEXO C - Questionário de Entrevista	79

1 INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço é um termo utilizado para descrever neoplasias malignas que se desenvolvem no trato aerodigestivo superior (DOBROSSY, 2005). Na cavidade bucal, o tumor maligno mais comum é o carcinoma epidermoide (CEB), representando mais de 90% dos casos (COOPER et al., 2009). Apesar dos avanços no tratamento nas últimas décadas, a maioria deles é ainda diagnosticada em estágio avançado e, consequentemente, o paciente apresenta um prognóstico ruim (BIAZEVIC et al., 2006). Em parte, esse prognóstico ruim se deve a ocorrência de metástase locorregional e à distância, fazendo com que a sobrevida desses pacientes em cinco anos seja menor que 50% (LEEMANS et al., 1994).

Assim, vários esforços têm sido realizados no sentido de buscar possíveis biomarcadores moleculares que possam contribuir com a predição prognóstica, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento de metástases. Dentre essas investigações têm-se destacado as proteínas da via de sinalização PI3K-Akt. Sabe-se que a ativação inapropriada dessa via de sinalização está associada com desenvolvimento e progressão de uma variedade de tumores malignos em humanos, incluindo os cânceres de cabeça e pescoço (MORAL; PARAMIO, 2008; ENGELMAN, 2009).

PI3Ks são uma família de quinases lipídicas responsáveis por ativar uma cascata de sinalização intracelular que culmina com a ativação da proteína Akt (WONG; ENGELMAN; CANTLEY, 2009). A importância da proteína Akt nessa via reside no fato de que quando se encontra num estado ativado é capaz de fosforilar proteínas envolvidas no controle da apoptose, na regulação do ciclo celular e crescimento celular, ou seja, estão diretamente implicadas com a biologia tumoral e que, quando ativadas de forma inadequada, podem eventualmente contribuir para o desenvolvimento e progressão tumoral (BRUHN et al., 2013; WILLEMS et al., 2012).

É possível encontrar na literatura estudos que propõe o envolvimento da via de sinalização PI3K-Akt especificamente na carcinogênese e progressão do carcinoma epidermoide bucal (CEB) (KOZAKI et al., 2006). No entanto, os mecanismos pelos quais ela contribui para o desenvolvimento e comportamento, como a ocorrência de metástases, ainda são desconhecidos (KOZAKI et al., 2006; PEDRERO et al., 2005; COHEN et al., 2011).

Embora trabalhos anteriores tenham avaliado o papel de algumas proteínas dessa via de forma isolada, não há ainda nenhum estudo analisando o papel delas, bem como seus

respectivos genes, de forma integrada no sentido de predizer a ocorrência de metástase e a relação delas com fatores clinicopatológicos de importância prognóstica para o CEB. Nesse sentido, estudar esses componentes pode ser crucial para o entendimento da patogenia desse tumor. Assim, o presente estudo buscou avaliar a expressão dessas proteínas e seus respectivos genes em uma amostra de conveniência de CEB metastático e não metastático buscando responder se eles estão envolvidos no fenômeno de metástase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma Epidermoide Bucal

Os cânceres de cabeça e pescoço são o sexto tipo de câncer mais comum no mundo (KAMANGAR, 2006; SIMARD; TORRE; JEMAL, 2014). Já o câncer de boca, que inclui os cânceres de lábio e mucosa bucal propriamente dita, compreende cerca de 30% deles (GENDEN; FERLITO; SILVER 2010). Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer, o câncer de boca é a sétima neoplasia maligna mais frequente no Brasil, sendo responsável por cerca de 11.280 novos casos/ano em homens e 4.010 novos casos/ano em mulheres (INCA, 2014). Mundialmente, esse tumor ocupa a décima primeira posição para o sexo masculino e a décima sétima para o sexo feminino, correspondendo 2,7% e 1,5% dos cânceres, respectivamente (FERLAY et al., 2012). O risco de desenvolver a doença é maior com o aumento do período de exposição aos fatores de risco e consequente aumento da idade, assim o câncer bucal tem uma predileção pelos pacientes do sexo masculino com a média de idade de 62 anos (FELLER; LEMMER, 2012; WARNAKUSARIYA, 2009). No entanto, essa relação de incidência homem/mulher vem decrescendo nas últimas décadas, enquanto que em sujeitos jovens têm aumentado (JOHNSON et al., 2005; WARNAKULASURIYA, 2009).

Dentre todas as malignidades que acometem a cavidade bucal, o CEB comprehende mais de 90% dos casos (WARNAKULASURIYA, 2009; GENDEN; FERLITO; SILVER, 2010). Definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma neoplasia epitelial invasiva com graus de diferenciação variando de bem a pobemente diferenciado e alta propensão para o desenvolvimento de metástases locorregional, o CEB tem como principais fatores de risco o tabaco e o álcool (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011). Além desses fatores, a falta de higienização oral e a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) também estão relacionados ao seu desenvolvimento (MISHRA, 2010). Quanto à localização, esse tumor pode ocorrer em qualquer região da cavidade bucal, mas de um modo geral, pode-se dizer que a sua ocorrência está relacionada ao fator de risco associado, como é o caso da lesão de lábio, a qual tem como principal agente causal a exposição crônica a radiação ultravioleta (JOHNSON et al., 2005). De um modo geral, os sítios mais frequentemente acometidos são assoalho bucal, borda lateral de língua e palato (JOHNSON et al., 2005).

O diagnóstico precoce é um dos fatores mais importantes para o paciente portador de CEB. Taxas de sobrevida entre 80-90% podem ser encontradas caso o diagnóstico seja realizado nos estágios iniciais da doença (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). No entanto, a detecção do CEB geralmente é realizada em estágios avançados devido, em parte, a ausência de sintomatologia nos estágios iniciais, o que segundo Bagan; Sarrion; Jimenez (2010) e Leemans; Braakhuis; Brakenhoff (2011) pode estar relacionado à heterogeneidade molecular interlesional, tornando variável o comportamento desse tumor entre os pacientes. Não obstante a isso, estudo realizado pelo nosso grupo mostrou que o atraso do paciente e do profissional também são fatores que podem contribuir para o atraso no diagnóstico da lesão (FARIA et al., 2005). Assim, a importância do autoexame, especialmente em pacientes que fazem uso do tabaco e álcool, e a identificação deles através de uma correta anamnese acompanhada de um cuidadoso exame clínico das mucosas pelo cirurgião dentista pode contribuir para o diagnóstico precoce.

As características clínicas do CEB variam de acordo com o estágio da doença. Nos estágios iniciais, o CEB pode se apresentar como uma lesão ulcerativa de coloração variando de eritematosa e brancacenta, firme à palpação e geralmente indolor (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; JOHNSON et al., 2005). Nos estágios avançados, por outro lado, nota-se uma lesão ulcerada infiltrativa com margens irregulares e de bordos elevados e endurecidos (FIGURA 1) (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; JOHNSON et al., 2005). Para esses pacientes, a sintomatologia está presente e pode variar de acordo com a localização, sendo os mais frequentes disfagia, odinofagia, dispneia e perda de peso (JOHNSON et al., 2005). Embora esses aspectos clínicos sejam os classicamente descritos na literatura, cabe mencionar que alguns pacientes podem desenvolver lesões potencialmente malignas, como leucoplasias, eritroplasias e, principalmente, as eritroleucoplasias, sendo que estas frequentemente demonstram displasia grave e/ou carcinoma no momento do diagnóstico (PITIYAGE et al., 2009).

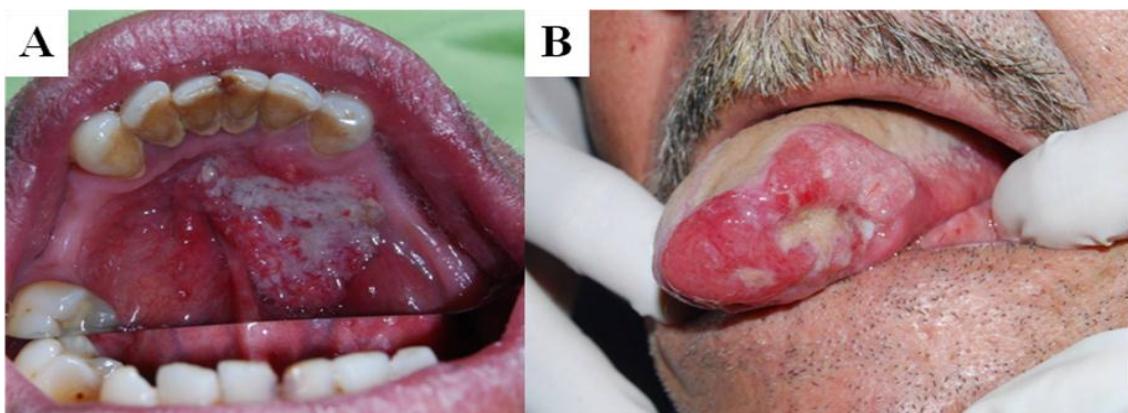


Figura 1 – Fotografias de pacientes com CEB em estágio avançado. Em A nota-se lesão ulcerativa em assoalho bucal. Em B pode-se notar outra lesão ulcerada em região lateral de língua de bordos elevados e endurecidos. Fonte: Fotografias retiradas na Unidade de Diagnóstico Estomatológico (UDE) da Universidade Federal de Uberlândia.

A biópsia é mandatória para confirmação do diagnóstico de CEB (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). Com relação ao aspecto histológico, o CEB é classificado de acordo com o grau diferenciação de suas células (FIGURA 2). Nos casos classificados como bem diferenciados as células neoplásicas se assemelham muito ao tecido epitelial de origem, mas com presença de certo grau de pleomorfismo nuclear (anisocariose) e citoplasmático (anisocitose), nucléolos evidentes e algumas figuras de mitoses. A queratinização abundante é um dos aspectos clássicos nos tumores com esse fenótipo. Naqueles tumores classificados como moderadamente diferenciados, observa-se um maior grau de anisocariose e anisocitose nas células neoplásicas, exibindo nucléolos grandes e múltiplos, maior taxa de mitoses típicas e atípicas e menor grau de queratinização. Por fim, os tumores classificados como pobremente diferenciados são compostos por células anaplásicas, mostrando numerosas figuras de mitoses típicas e atípicas, e queratinização mínima ou ausente (JOHNSON et al., 2005).

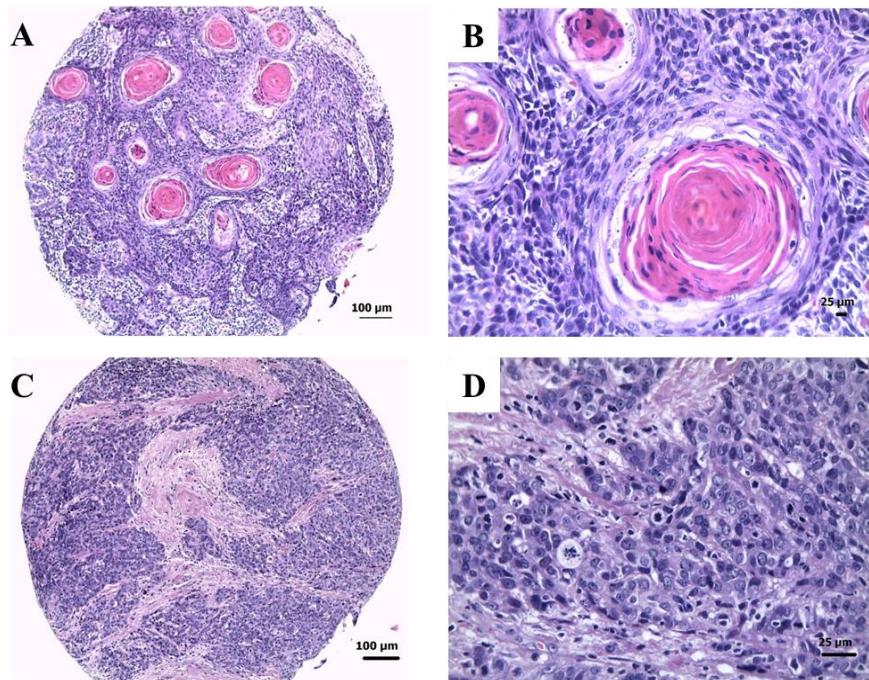


Figura 2 – Cortes histológicos corados em H&E. Em A, nota-se o *spot* do TMA com um caso de CEC bem diferenciado com presença de pérolas de queratina. Em B, evidencia-se em maior aumento os detalhes da pérola de queratina. Em C, observa-se outro caso de CEC classificado como pobemente diferenciado. Em D pode-se notar a presença de pleomorfismo celular e hipercromatismo nuclear. Hematoxilina e Eosina (aumento original em A e C: 100X e em B e D: 400X).

Para a escolha do melhor tratamento para os pacientes portadores de CEB, leva-se em consideração a natureza do carcinoma e a condição geral do paciente, que inclui idade, estado de saúde e o histórico do paciente (FELLER; LEMMER, 2012). De maneira geral, o tratamento do CEB é feito primariamente por cirurgia podendo ser acompanhado de radio e quimioterapia. Todo o tratamento proposto para os pacientes com CEB se baseia no estadiamento clínico através do sistema TNM (T: tamanho do tumor; N: presença e extensão de metástase linfonodal; M: presença ou ausência de metástase à distância) desenvolvido pela *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) e da *American Committee on Cancer* (AJCC). Nas lesões iniciais, a cirurgia ou radioterapia são os tratamentos de escolha e tem como foco a busca pela cura. Já nos casos avançados, a combinação de quimioterapia (terapia sistêmica) e radioterapia e/ou cirurgia (terapia local) são frequentemente utilizados (FELLER; LEMMER, 2012).

No que diz respeito ao prognóstico, a presença de metástase locorregional é um dos fatores mais importantes para a determinação do prognóstico do paciente, influenciando diretamente sobre a sobrevida do mesmo, que pode reduzir a metade (LEEMANS et al., 1994; CORTESINA; MARTONE, 2006). Metástase pode ser interpretada como um processo

dinâmico em que clones de células adquirem a capacidade de invadir e disseminar para outros órgãos (KLEIN, 2009; NOGUTI et al., 2012). Muitas moléculas estão envolvidas nesse processo e a compreensão cada vez maior dos mecanismos moleculares envolvidos tem permitido o estudo de biomarcadores preditivos de metástase. No entanto, ainda não existe na literatura um consenso a cerca dos mecanismos moleculares envolvidos (CORTESINA; MARTONE, 2006, OLIVEIRA; SILVA, 2010). Sobre esse fenômeno, a região de cabeça e pescoço, que é rica em drenagem linfática e cadeias linfonodais (cadeias I, II, III, IV, V e VI) são frequentemente acometidos por lesões metastáticas (JOHNSON et al., 2005; HOLMES, 2008). Estima-se que 40% dos pacientes com CEB desenvolvem metástases, com apenas 25% a 40% deles sobrevivendo em 5 anos, uma taxa baixa se comparado com 90% dos pacientes sem lesão metastática (NOGUTI et al., 2012). Clinicamente, o linfonodo cervical acometido por metástase pode ser identificado com uma consistência firme, fixado, aumentado (maior que 1cm) e indolor (NOGUTI et al., 2012). Apesar de alguns indicadores prognósticos serem por vezes preditivos de desenvolvimento da metástase, como, por exemplo, o tamanho do tumor primário, estágio, sítio acometido, grau de diferenciação e profundidade de invasão, tais parâmetros prognósticos subestimam a presença da metástase cervical (NOGUTI et al., 2012; CORTESINA; MARTONE, 2006). De fato, a presença de metástases ocultas é alta, mesmo em paciente em estágio inicial. Um estudo realizado por Teichgraeber e Clairmont (1984) com 136 pacientes, encontrou metástases ocultas em 37% dos pacientes em estágio inicial de CEB. Além disso, outro importante fator que pode influenciar a sobrevida do paciente é disseminação extracapsular das lesões metastáticas, com sobrevida de 30% para 3 anos (JOHNSON et al., 2005; WOOLGAR et al., 2003).

Dessa forma, estudos com biomarcadores capazes de auxiliar a previsão de metástase juntamente com os fatores prognósticos podem ser fundamentais para o estabelecimento de novas estratégias diagnósticas, bem como um tratamento mais adequado para cada tipo de paciente.

2.2 Via de Sinalização PI3K-Akt

A ativação da via de sinalização tem início com a ligação de fatores de crescimento, como por exemplo, o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF1) a receptores tirosina quinases (RKTs) na membrana (CARNERO, 2010; ENGELMAN, 2009). Ao se tornar ativa,

a PI3K medeia a fosforilação do anel inositol do fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP2) para gerar o segundo mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) no folheto interno da membrana plasmática (OSAKI; OSHIMURA; ITO 2004; PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014). Essa fosforilação promove o recrutamento de proteínas com o domínio homólogo a *pleckstrin* (PH), que são domínios de proteínas globulares de aproximadamente 120 aminoácidos presentes em proteínas, tais como a Akt e fosfoinositídeo Pdk1 (VAHASENBROEK, 2012; ENGELMAN, 2009). Assim, ao ser recrutada à membrana plasmática, a proteína Akt interage com PIP3, levando a uma mudança conformacional e exposição dos resíduos de treonina 308 (Thr308) e serina 473 (Ser473), o que permite a fosforilação desses sítios pelo fosfoinositídeo Pdk1 e pelo complexo mTORC2 respectivamente, tornando a Akt completamente ativa e portanto, capaz de fosforilar múltiplos substratos de efeitos variados (NICHOLSON; ANDERSON, 2002; OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004; VAHASENBROEK, 2012; BRUHN et al., 2013). Apesar da via de sinalização PI3K-Akt poder desencadear uma série de eventos que podem culminar com crescimento celular, sobrevivência celular e angiogênese, um mecanismo inibitório mediado pela fosfatase PTEN, que converte PIP3 em PIP2, também pode ser observado (VIVANCO; SAWYERS, 2002). *PTEN* foi inicialmente isolado como um gene supressor tumoral em câncer de mama e glioblastoma e, mais recentemente, tem sido implicado na patogênese de um amplo espectro de lesões tumorais (LIU et al., 2009; NICHOLSON; ANDERSON, 2002). Nesse sentido, o silenciamento de *PTEN* leva a uma retomada da ativação dessa via de sinalização e o aparecimento de tumores (CANTLEY; NEEL, 1999). Isso tem sido confirmado em camundongos *knockout* para esses genes (VIVANCO; SAWYERS, 2002).

2.3 Estrutura e função de PI3K, Akt, mTOR e GSK3 β

2.3.1 PI3K

A PI3K consiste em família de quinases lipídicas distribuídas em três classes denominadas de I, II e III, as quais são classificadas de acordo com estrutura, função e especificidade ao substrato (VANHAESEBROECK; STEPHENS; HAWKINS, 2012; BRUHN et al., 2013). A PI3K de classe I consiste em dois subgrupos, IA e IB, os quais são heterodímeros constituídos de uma subunidade catalítica e outra regulatória. O subgrupo IA

corresponde a um heterodímero formado pela subunidade regulatória N-terminal denominada p85, a qual é constituída pelas subunidades p85 α , p55 α e p50 α e são codificadas por um único gene, o *PIK3R1* e pela subunidade catalítica p110, a qual é constituída pelas subunidades p110 α , p110 β e p110 δ e codificadas pelos genes *PIK3CA*, *PIK3CB* e *PIK3CD*, respectivamente (BRUHN et al., 2013). O subgrupo IA pode ser ativado diretamente por RTKs, ou indiretamente através de moléculas adaptadoras, tais como ligantes do receptor de insulina IRS. O subgrupo IB consiste nas subunidades p110 γ e p101 ou p87, as quais são codificadas pelos genes *PIK3CG*, *PIK3R5*, *PIK3R6*, respectivamente, e é ativado por receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (WILLEMS et al., 2012; VANHAESEBROECK; STEPHENS; HAWKINS, 2012; SAJI; RANGEL, 2010; VIVANCO; SAWYERS, 2002; BRUHN et al., 2013). Ambas as subclasses IA e IB ativam a via canônica PI3K-Akt, porém a subclasse I tem se destacado, pois na maioria das vezes, está relacionada com alterações genéticas, mutações, amplificação gênica e câncer (SAJI; RINGEL, 2010; KOZAKI et al., 2006).

A ativação de RTKs ou ativação das moléculas adaptadoras IRS1 e IRS2 resulta na autofosforilação dos resíduos de tirosina citoplasmáticos e recrutamento de PI3K para membrana, a qual se liga diretamente às tirosinas fosforiladas, culminando na ativação alostérica da subunidade catalítica p110. A PI3K ativada é capaz de fosforilar PIP2 em PIP3, um segundo mensageiro essencial para o recrutamento da proteína Akt e, portanto, fundamental para a ativação dessa via de sinalização (PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014; VIVANCO; SAWYERS, 2002).

O produto do gene *PIK3CA* é a subunidade catalítica p110 α da PI3K, o qual é considerado um oncogene comumente mutado em cânceres humanos, com um índice aproximado de 10% em carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço (DU et al., 2012). Quase todas as mutações em *PIK3CA* estão relacionadas a um ganho de função, porém amplificação gênica tem sido relatada em CEB (DU et al., 2012; PEDRERO et al., 2005). Mutações de ganho de função em *PIK3CA* já foram associadas à metástase linfonodal (FENIC et al., 2007). No entanto, o aumento de amplificação de *PIK3CA* e sua associação com metástase linfonodal e estágio avançado ainda permanecem controversos na literatura (PEDRERO et al., 2005; KOZAKI et al., 2006).

2.3.2 AKT

A Akt é uma proteína quinase serina/treonina composta de três domínios: (1) o domínio de PH na região N-terminal, (2) o um domínio central catalítico e (3) o domínio regulatório localizado na região C-terminal (VADLAKONDA et al., 2013; PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014) (FIGURA 3). A proteína Akt é muito versátil e participa de muitos processos fisiológicos, tais como o metabolismo de glicose, apoptose, proliferação, transcrição e migração, já foram registrados mais de 100 substratos diferentes que podem ser regulados pela mesma (CARNERO, 2010; TSUCHIYA; KANNO; NISHIZAKI, 2014).

Os mamíferos contêm três isoformas intimamente relacionadas (80% de homologia) e conhecidas como Akt1, Akt2 e Akt3, as quais são expressas ubliquamente, mas com níveis variados entre os diferentes tecidos (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004). Todas as três isoformas podem ser recrutadas para a membrana por meio do domínio N-terminal PH e, dessa forma, serem capazes de interagir com PIP3 e assim dar continuidade a via PI3K-Akt (MARTELLI et al., 2012). Elas são fosforiladas em sítios distintos, sendo nos resíduos de Thr308, Ser473 na Akt1, Thr309 e Ser474 na Akt2, e Thr305 e Ser472 (FIGURA 3).

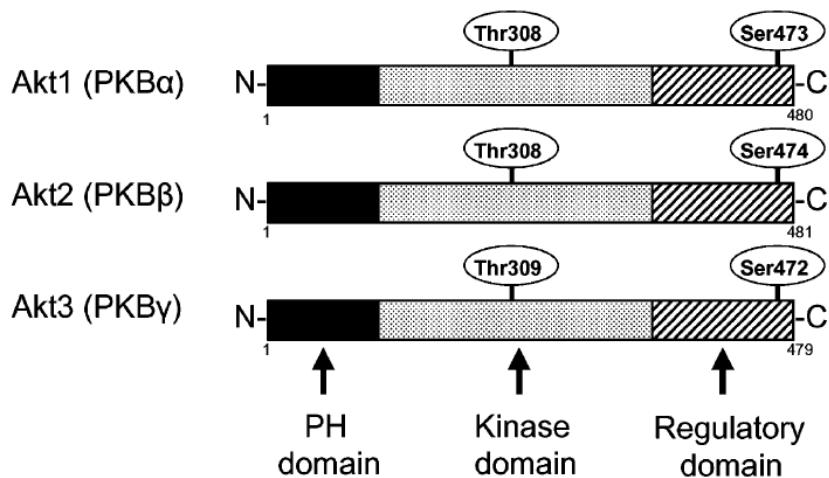


Figura 3 – Ilustração esquemática das três isoformas da proteína Akt (Akt1, Akt2 e Akt3). Fonte: OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004.

Os sítios de fosforilação mais bem estudados são os pertencentes a Akt1, como as fosforilações nos sítios Thr308 e Ser473 (GIUDICE; SQUARIZE, 2013). Os resíduos de Thr308 são fosforilados pela proteína Pdk1, enquanto que os resíduos de Ser473 são, de maneira geral, fosforilados pelo complexo mTORC2. A fosforilação no sítio Thr308 permite que a proteína Akt fosfore a apenas alguns substratos, embora nem todos, enquanto que a

fosforilação no sítio Ser473 promove a ativação total da proteína Akt (MARTELLI et al., 2012). Sabe-se que a ativação total da proteína Akt é relevante para a patogenia do câncer, pois nesse estado é capaz de interferir na sobrevida, proliferação e crescimento (VIVANCO; SAWYERS, 2002). Além disso, promove a angiogênese através da mediação dos fatores HIF-1 α e de VEGF (ALTOMARE; TESTA, 2005).

Quanto à expressão delas, a proteína Akt1 está mais expressa no tecido cerebral, coração e pulmões e está associada com hipertrofia muscular esquelética, aumento de síntese proteica, sobrevivência celular e proliferação (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004; GONZALEZ; MCGRAW, 2009); a Akt2 é predominantemente expressa nos músculos esqueléticos e no tecido adiposo marrom onde regula a internalização da glicose via receptor GLUT4; a Akt3 é mais expressa em cérebro e rins, mas seu papel ainda não foi totalmente elucidado. Sabe-se que camundongos *knockout* para Akt3 tem redução do tamanho cerebral, retardo no crescimento e alteração no metabolismo de glicose (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004; TSUCHIYA; KANNO; NISHIZAKI, 2014; FORTIER et al., 2010).

Embora as isoformas pareçam desenvolver alguns papéis distintos, algumas funções se sobrepõem. Todas as isoformas têm sido encontradas alteradas em diversos tipos de cânceres. Por exemplo, a expressão de Akt1 está aumentada em cânceres de mama, ovário, próstata e adenocarcinomas de pulmão, enquanto que a Akt2 e Akt3 apresentam níveis elevados em cânceres de mama e ovário e melanomas e cânceres de mama, respectivamente (FORTIER; et al., 2010). Na literatura é possível encontrar estudos com carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço mostrando aumento da amplificação do gene *AKT2* (IAMAROON; KRISANAPRAKORNKIT, 2009; PEDRERO et al., 2005). Alguns estudos sugerem funções distintas das isoformas na regulação da progressão do ciclo celular, migração e invasão, o que pode levar a diferentes papéis na modulação do tumor e desenvolvimento de metástases, embora os mecanismos sejam ainda obscuros (ENGELMAN, 2009; NICHOLSON; ANDERSON, 2002; MORAL; PARAMIO, 2008; GONZALEZ; MCGRAW, 2009).

No que diz respeito à sobrevivência celular, a Akt ativada é capaz de controlar a apoptose através de ativação e inativação de proteínas chave. Assim, ela pode inativar proteínas pró-apoptóticas, tais como BAD da família Bcl-2, e promover a morte celular através da formação de um heterodímero com Bcl-X_L (VIVANCO; SAWYERS, 2002; ALTOMARE; TESTA 2005). Além disso, inibe a atividade catalítica da caspase-9 mediante sua fosforilação (VIVANCO; SAWYERS, 2002), como também proteínas *forkhead*, incluindo a proteína FOXO, a qual inibe fatores pró-apoptóticos, como o ligante do Fas (PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014; ALTOMARE; TESTA, 2005). Somado a isso, essa

proteína é também capaz de regular positivamente o fator de transcrição NFκB promovendo a sobrevivência em resposta a apoptose (VIVANCO; SAWYERS, 2002).

2.3.3 *mTOR*

TOR é uma proteína que foi identificada em bactéria nos anos 90 e tem como principal característica a resistência a fatores inibitórios de crescimento da rapamicina. A rapamicina, por sua vez, é um metabólico antifúngico purificado de *Streptomyces hygroscopicus* de propriedades imunossupressoras (DOBASHI et al., 2011). As proteínas TORs pertencem a uma família de quinases conhecida como PIKK, que são estruturalmente similares a PI3K. Elas estão relacionadas ao controle do crescimento celular e manutenção do comprimento do telômero (DOBASHI et al., 2011). Existe apenas um único gene *mTOR* nos mamíferos que codifica a proteína mTOR. No entanto, a proteína mTOR interage com proteínas regulatórias para formar dois complexos sinalizadores funcionalmente distintos conhecidos como mTORC1 e mTORC2, os quais são responsáveis pela síntese proteica e crescimento celular (WILLEMS et al., 2012; DOBASHI et al., 2011). mTOR apresenta quatro sítios de fosforilação identificados como Ser1261, Thr2446, Ser2448 e Ser2481, sendo Ser2448 promovida pela proteína Akt. No entanto, sabe-se que a proteína S6K1 também medeia essa fosforilação (JAQUEZ et al., 2009; NAVÉ et al., 1999).

O mTORC1, constituído por mTOR, LST8/G β L e RAPTOR, é reconhecido por participar de diversas sinalizações extra e intracelulares a fim de promover anabolismo (FOSTER; FINGAR, 2010). Nutrientes e fatores de crescimento promovem a síntese proteica dependente de mTORC1, o que contribui para o crescimento, proliferação e metabolismo celular. Quando ocorre deficiência desses nutrientes ou a célula é submetida a um estresse, mTORC1 atua no sentido de manter as condições ótimas de funcionamento celular, promovendo, por exemplo, macroautofagia (FOSTER; FINGAR, 2010). O complexo também é responsável por fosforilar e ativar a proteína S6K1 para promover a tradução de oligopirimidinas do RNA mensageiro (RNAm) na região 5'- terminal, culminando com a codificação de proteínas ribossomais e fatores de alongamento (FOSTER; FINGAR, 2010). Além disso, mTORC1 é capaz de fosforilar a proteína 4E-BP1 que, num estado hipofosforilado, funciona como um repressor tradicional ligando e inibindo o fator de iniciação eIF4E (FOSTER; FINGAR, 2010; WILLEMS et al., 2012; PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014). Quanto à síntese de proteínas, estudos têm mostrado que esse complexo

promove a produção de proteínas relacionadas com a progressão do ciclo celular, tais como ciclina D1 e c-myc, e angiogênese, como os fatores HIF-1 α e VEGF (WILLEMS et al., 2012; ALTOMARE; TESTA, 2005; PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014, SHIOJIMA, 2002). Em relação à via PI3K-Akt, ela pode ativar indiretamente mTORC1 através do substrato TSC2, que junto com o substrato TSC1 formam um complexo inibitório de mTORC1. A inativação de TSC2 pela Akt ativa um domínio denominado GAP que, por sua vez, atua na proteína Rheb, uma pequena proteína que se liga ao GTP e ativa mTORC1 por mecanismos ainda não totalmente elucidados. Em resumo, a ativação de mTORC1 aumenta então a tradução de proteínas que podem ter papel importante na patogênese de vários tumores (PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014; EKIM et al., 2011).

Quanto ao mTORC2, trata-se de um complexo constituído por mTOR, G β L e RICTOR. É capaz de fosforilar a proteína Akt no resíduo Ser473, levando a sua ativação total e, por consequência, da via PI3K-Akt. A função principal de mTORC2 é a organização da actina do citoesqueleto, influenciando o controle do tamanho celular, mas também no processo de transição epitélio-mesênquima (VADLAKONDA et al., 2013; FOSTER; FINGAR, 2010).

Por fim, a expressão da mTOR já foi avaliada por vários trabalhos e alguns deles mostram aumento da expressão em cânceres de pulmão, tumores gastrointestinais e em linhagem celular de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (LIU et al., 2009; DOBASHI et al., 2011; LI et al., 2013).

2.3.4 GSK3 β

Em relação à progressão do ciclo celular, outro importante substrato da Akt é a proteína quinase serina/treonina GSK3 β . Essa proteína está constitutivamente ativa em células normais e está envolvida em muitos processos celulares, tais como o metabolismo de glicogênio, regulação do citoesqueleto, estabilidade dos microtúbulos e controle do ciclo celular (LUO, 2009). Por ser uma proteína multifuncional, ou seja, participar de várias vias de sinalização regulando muitas proteínas-chaves, como, por exemplo, a β -catenina na via de sinalização Wnt, quando desregulada, pode ser responsável pelo desenvolvimento de várias doenças como câncer, diabetes, problemas cardiovasculares e desordens degenerativas (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007). A atividade da GSK3 β é regulada pela fosforilação sítio-específica. Na sua forma inativa, a GSK3 β é fosforilada no resíduo de serina na posição 9

(Ser9), enquanto que na sua forma ativa é fosforilada no resíduo de tirosina na posição 216 (Tyr216), aumentando a sua atividade enzimática em aproximadamente cinco vezes (LUO, 2009). A proteína Akt em sua forma ativa é capaz de inativar GSK3 β via fosforilação do resíduo Ser9 localizado na sua porção N-terminal (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004; LUO 2009).

No citoplasma, a proteína GSK3 β participa de um complexo multiproteico formado pela axina, proteína APC e CK1, cuja função é promover a degradação da proteína β -catenina via complexo de destruição ubiquitina-proteossomo, fosforilando-a e marcando-a com ubiquitina pela proteína β -TrCP (CLEVERS, 2006). Por outro lado, quando a GSK3 β é inativada, o complexo multiproteico deixa de fosforilar a β -catenina que, por consequência, não é degradada e o seu nível citoplasmático aumenta, culminando com a sua translocação ao núcleo (CLEVERS, 2006). No núcleo, β -catenina se liga a fator de transcrição da TCF/LEF promovendo a transcrição de genes alvo da via de sinalização Wnt, tais como os genes *MYC*, *CCND1*, *JUN*, *MMP1* e *MMP7* (FARAGO et al., 2005; LUSTIG; BEHRENS, 2003).

Além das funções fisiológicas exercidas pela GSK3 β , estudos recentes têm observado que essa proteína tem participação direta nos processos de transformação neoplásica, crescimento do tumor e metástases (DOBLE; WOODGETT, 2007; LUO, 2009; MISHRA, 2010). Sobre o este ultimo papel, é de amplo conhecimento que aumento da motilidade e invasão das células cancerosas são os eventos que ocorrem primariamente no processo de metástase, um fenômeno conhecido como transição epitélio-mesênquima (LUO, 2009). De um modo geral, as caderinas interagem com a actina do citoesqueleto para manter a estrutura tecidual, mas nos carcinomas, incluindo o CEB, a perda de E-caderina favorece a invasão das células (MISHRA, 2010). A GSK3 β , por fim, tem papel fundamental nesse processo, pois promove a degradação da proteína Snail, inibe a transcrição do gene *CDH1*, responsável por codificar a proteína E-caderina, proporcionando um aumento da invasão e metástase (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007). Por fim, cabe mencionar que moléculas da matriz extracelular implicadas com a progressão de CEB, como o colágeno, fibronectina, tenascina, laminina e integrinas, são também alvos indiretos da GSK3 β via proteína Snail, o que reforça ainda mais o seu papel do desenvolvimento de metástase (MISHRA, 2010).

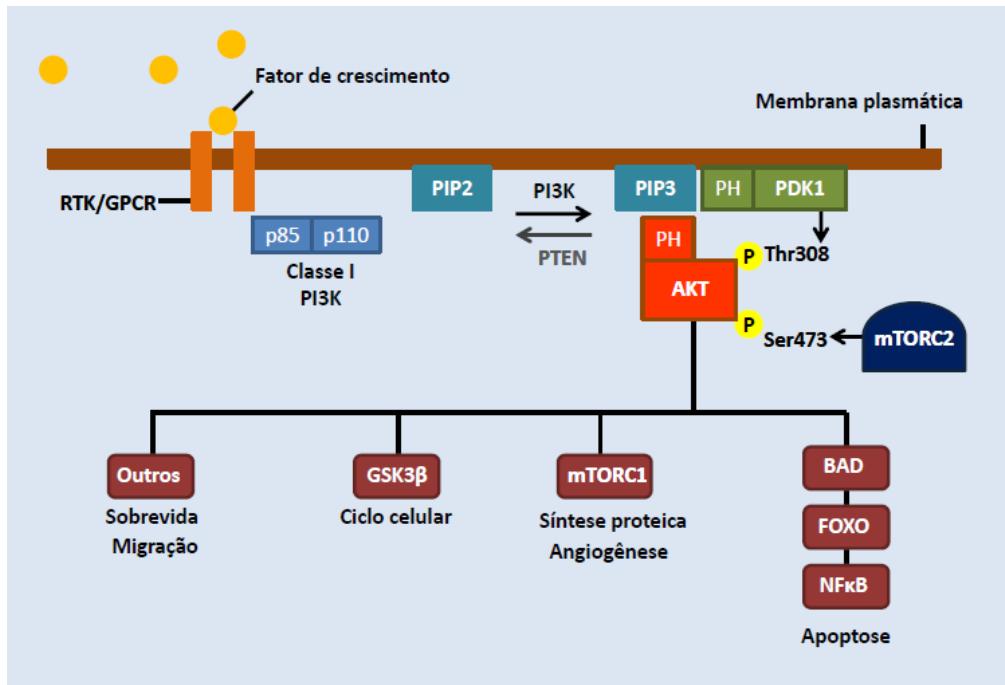


Figura 4 – Ilustração esquemática resumida do mecanismo da via de sinalização PI3K-Akt. Fonte: elaborado pela autora.

2.4 A via de sinalização PI3K-Akt em CEB

Nos últimos anos, muitos trabalhos têm focado no estudo de vias de sinalização ativadas por receptores RTKs e que envolve as moléculas PI3K e Akt, tal que tem sido considerada como uma importante via reguladora de sobrevivência e proliferação celular em mamíferos (VIVANCO; SAWYERS, 2002). Dados recentes da literatura mostram que a via de sinalização PI3K-Akt, está desregulada em vários tipos de cânceres, como de mama, ovário, endométrio, pulmão, tireoide e fígado (MORAL; PARAMIO, 2008). Além disso há indícios de que essa via de sinalização realmente esteja envolvida com o desenvolvimento do CEB (DU et al., 2012; GIUDICE; SQUARIZE, 2013).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de analisar as alterações no gene *PIK3CA*, trabalhos como de Pedrero et al. (2005) mostram a amplificação do gene em aproximadamente 40% dos casos de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, apesar de não encontrar nenhuma correlação clinicopatológica. Já no estudo de Kozaki et al. (2006), foi demonstrado uma correlação significativa entre estágios mais avançados de CEB e amplificação do gene *PIK3CA* quando comparados com estágios iniciais da doença. Outras abordagens tais como mutações de ganho de função no gene *PIK3CA* também já foram

relatados em estudos como de Fenic et al. (2007) que mostraram a correlação dessa mutação com metástase em linfonodos e estágio tumoral em carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço. Trabalhos que também buscaram identificar mutações de *PIK3CA* em carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço como de Qiu et al. (2006), Cohen et al. (2011), reforçam as propriedades oncogênicas do início da via de sinalização em carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço, sem no entanto, encontrar correlação com os dados clinicopatológicos.

Outros trabalhos têm confirmado o papel dessa via na patogênese do câncer através do estudo da expressão das isoformas da proteína Akt, como é o caso do estudo de Amornphimoltham et al. (2004), que mostraram a ativação de Akt1 e progressão de carcinogênese em pele de camundongos, assim como em carcinomas de cabeça e pescoço de humanos. O aumento da expressão da isoforma Akt2 em CEB também foi descrito por Iamaroon e Krisanaprakkornkit (2009). Ainda é possível encontrar na literatura estudos com a forma fosforilada e ativa da proteína Akt, como é o caso dos trabalhos de Lim et al. (2005) e Massarelli et al. (2005) que também mostraram associação entre a expressão de pAKT-Ser473 e alguns fatores prognósticos em CEB, bem como de Li et al. (2013) que também demonstrou evidências de associação entre fatores prognósticos e a expressão de pAKT1-Thr308 em CEB. Os subprodutos da ativação da via Akt, como é o caso de mTOR também tem alguns indícios de ativação em carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço, como no trabalho descrito por Liu et al. (2010) bem como para GSK3 β , que mostra-se inativa em algumas linhagens celulares de CEB (MISHRA, 2010).

Como já detalhado acima as funções biológicas da Akt ativa são enormes em virtude de sua capacidade de regular uma centena de substratos proteicos. Portanto, nota-se pela literatura que proteínas dessa via podem atuar sobre o processo de metástase. Apesar dos vários trabalhos citados mostrarem indícios da ativação da via de sinalização PI3K-Akt não existe ainda um consenso acerca do envolvimento da via de sinalização com a progressão do CEB, especialmente no que diz respeito à ocorrência de metástase. Além disso não há na literatura um trabalho que busque investigar a expressão de todos os principais componentes da via, incluindo seus subprodutos bem como a avaliação das respectivas expressões gênicas com foco na progressão do CEB. Nesse sentido, a avaliação da expressão funcional dos genes dessas via e de seus produtos proteicos em CEB poderá trazer novas informações para a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados ao desenvolvimento e a progressão tumoral diferenciando entre os pacientes com potencial ou não de desenvolver metástase.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar o padrão de transcrição de genes pertencentes a via de sinalização PI3K-Akt e GSK3 β bem como os seus respectivos produtos proteicos fosforilados e não fosforilados em uma amostra de CEB metastático e não metastático obtidos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia e Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia e relação da expressão deles com fatores clinicopatológicos.

3.2 Específicos

- 3.2.1 Tabular e descrever os dados clinicopatológicos da amostra de CEB de pacientes metastáticos e não metastáticos;
- 3.2.2 Avaliar a expressão das proteínas GSK3 β , pGSK3 β -Ser9, AKT total, pAKT1-Thr308, pAKT-Ser473 e pmTOR2448 em fragmentos parafinados de pacientes com CEB e grupo controle;
- 3.2.3 Avaliar a expressão das proteínas GSK3 β , pGSK3 β -Ser9, AKT total, pAKT1-Thr308, pAKT-Ser473 e pmTOR2448 em fragmentos parafinados de CEB de pacientes metastáticos e não metastáticos;
- 3.2.4 Associar a expressão das proteínas GSK3 β , pGSK3 β -Ser9, AKT total, pAKT1-Thr308, pAKT-Ser473 e pmTOR2448 com fatores clinicopatológicos na amostra de CEB de pacientes metastáticos e não metastáticos;
- 3.2.5 Quantificar a expressão gênica dos genes *PIK3CA*, *Akt1*, *Akt2*, *Akt3*, *mTOR* e *GSK3 β* em fragmentos cirúrgicos de pacientes com diagnóstico de CEB.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Federal de Uberlândia (CAAE: 00593312.1.0000.5152), segundo o parecer de número 5715 (ANEXO A).

4.1 Casuística

Amostras parafinadas (coletadas retrospectivamente, n=90) de CEB (CID: C00 a C06 e C09 e C10) arquivadas no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia e Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no período de janeiro de 2006 a fevereiro de 2013 e amostras cirúrgicas (coletadas prospectivamente, n = 16) obtidas durante exérese do tumor de pacientes com CEB (CID: C00 a C06 e C09 e C10), como parte do protocolo de tratamento no Hospital de Clínicas da UFU no período entre janeiro de 2013 a dezembro de 2014 foram usadas no estudo. O grupo controle utilizado para a análise imuno-histoquímica (n = 16) constituiu-se de fragmentos de tecidos epiteliais histologicamente normais advindos de margens adjacentes de alguns pacientes do grupo CEB, bem como de pacientes diagnosticados com hiperplasia e aqueles cujo laudo evidenciou ausência de alterações histológicas. O grupo controle utilizado para o experimento de *Real Time PCR* (n = 7) constituiu-se de mucosas de bochecha doadas espontaneamente por indivíduos saudáveis e de mucosas adjacentes a mucoceles tratadas por exérese na Unidade de Diagnóstico Estomatológico da Faculdade de Odontologia da UFU. Todos os pacientes empregados no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B). Além disso, todos os casos selecionados tiveram suas lâminas recuperadas para confirmação do diagnóstico de CEB de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (BARNES et al., 2005).

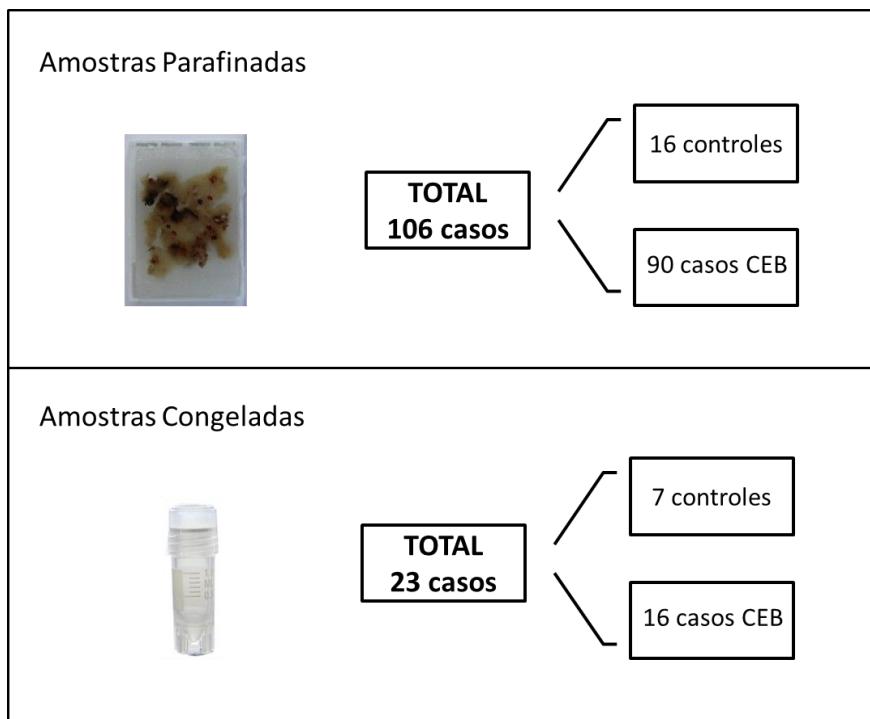


Figura 5 – Distribuição da casuística nos grupos de CEB e controle para as amostras parafinadas e congeladas.

Para as amostras coletadas retrospectivamente, os critérios de inclusão foram presença de amostra tumoral em quantidade suficiente para realização do ensaio de *Tissue Microarray* (TMA) em duplicata, dados sociodemográficos e clinicopatológicos completos. Para as amostras coletadas prospectivamente (congeladas) o critério de inclusão foi a indicação de tratamento cirúrgico para a remoção da lesão. Os critérios de exclusão foram ausência de blocos de parafina, dados sociodemográficos e clinicopatológicos incompletos, perda de seguimento e o não tratamento cirúrgico do paciente.

Informações sociodemográficas e clinicopatológicas dos pacientes participantes foram obtidas a partir de consulta aos prontuários médicos. Todos os dados foram coletados através do uso de um instrumento de coleta qualificado (questionário semiestruturado) (ANEXO C) e as informações relativas às características sociodemográficas dos pacientes, como idade (≤ 55 anos e > 55 anos), sexo, cor e comportamentos relacionados à doença (tabagismo e etilismo), e clinicopatológicos, como sintomatologia, tempo de evolução (< 3 meses, $\geq 3 < 6$ meses ou ≥ 6 meses), localização, tamanho (≤ 4 cm e > 4 cm), estadiamento, graduação histológica, tratamento, metástase, recidiva e condição clínica (vivo sem doença, vivo com doença e óbito) foram levantadas de forma detalhada.

Para o estadiamento dos pacientes, utilizou-se o sistema estabelecido pela *International Union Against Cancer* (UICC) *American Committee on Cancer* (AJCC) (SOBIN et al., 2009), conforme Tabela 1. Para a graduação histológica dos tumores, empregou-se os critérios estabelecidos pela OMS (BARNES et al., 2005), como segue: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado. A presença de metástase locoregional foi inicialmente estabelecida por exames de imagem (Tomografia Computadorizada) e depois confirmada por exame histopatológico dos linfonodos coletados durante o esvaziamento cervical do paciente no transcurso da cirurgia. A confirmação de metástase foi usada para categorizar os pacientes com CEB em dois grupos: aqueles com tumores primários não metastáticos (PNM) e primários metastáticos (PM) para fins comparativos quanto à expressão das proteínas e genes investigados.

Tabela 1 – Estadiamento clínico segundo os critérios estabelecidos pela *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) e da *American Committee on Cancer* (AJCC) (SOBIN et al., 2009).

Estágio	Classificação TNM
I	T1N0M0
II	T2N0M0
III	T3N0M0 ou T1, T2, T3 com N1
IV	T4N0M0 ou qualquer T com N2, N3, ou qualquer lesão com M

4.2 Tissue Microarray (TMA)

Para o estudo da expressão das proteínas GSK3 β , pGSK3 β -Ser9, AKT total, pAKT1-Thr308, pAKT-Ser473 e pmTOR2448, empregou-se o arranjo em matriz de amostras teciduais descrita por Kononen et al. (1998) conhecida como TMA. Essa técnica consiste na incorporação de amostras de tecidos diferentes em um bloco de parafina de tamanho normal, o bloco de tecido “multitumor”, o que permite o estudo e análise de expressão de marcadores moleculares em larga escala, com grande aproveitamento de material arquivado, redução de tempo e custo, com o uso de pequena quantidade de tumor, e uniformização das reações e facilidade na análise comparativa dos casos (ANDRADE et al., 2007).

Para cada bloco recuperado, foram selecionadas duas áreas tumorais (duplicata) situadas lateralmente mas respeitando a presença de células tumorais. Em seguida, selecionou-se a lâmina que continha a maior quantidade de tumor para evitar erro amostral no TMA (FIGURA

6). Para selecionar as duas áreas na lâmina, utilizou-se um microscópio de campo claro (Nikon) no aumento de 10x. As duas regiões selecionadas foram então marcadas na lâmina com uma caneta de retroprojector e, depois, transferidas no respectivo bloco por sobreposição. Para confecção do TMA, utilizou-se o *core facilite* do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA). Todo o procedimento de construção do TMA está representado na Figura 6. Assim, a partir do bloco doador, uma agulha de captura de 1 mm de diâmetro foi introduzida no bloco doador e, em seguida, transferido para o bloco receptor obedecendo um padrão de matriz espaçado de precisão com núcleos de um milímetro de diâmetro. A localização de cada amostra tumoral no TMA em duplicata foi devidamente identificada no mapa do TMA (FIGURA 7). Por fim, o bloco receptor foi cortado, sendo duas delas (inicial e final) coradas em H&E, e as demais para ensaio imuno-histoquímico.

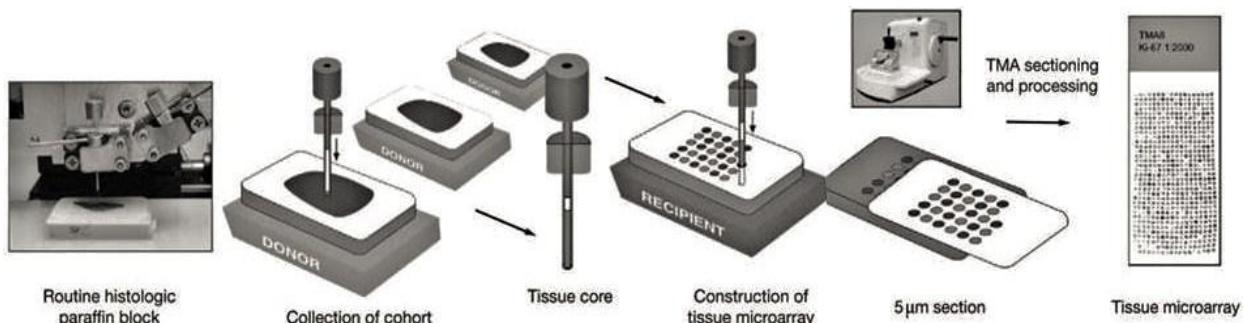


Figura 6 – Princípio básico da técnica para a construção de matrizes teciduais (TMA). Uma área definida previamente é retirada do bloco doador (*donor*) através de uma “agulha oca”, esse fragmento é recolocado no bloco receptor (*recipient*), então o bloco é cortado em micrótomo e processado. Fonte: Giltnane e Rimm (2004).



Figura 7 – Mapa do TMA mostrando a posição de cada caso na lâmina. As linhas 6 e 14 são as lesões metastáticas.

4.3 Ensaio imuno-histoquímico

A técnica utilizada para identificação da expressão das proteínas GSK3 β , pGSK3 β -Ser9, AKT total, pAKT1-Thr308, pAKT-Ser473 e pmTOR2448 foi a estreptavidina-biotina-peroxidase, todos os anticorpos utilizados foram IgG policlonais de coelho, todos adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology®, com exceção do anticorpo anti-AKT total, o qual foi adquirido uma alíquota produzida e doada pela UNICAMP. As diluições consideradas para cada anticorpo, controle positivos, bem como a referência dos mesmos estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2 – Especificações dos anticorpos usados de acordo com as respectivas diluições padronizadas, controles positivos empregados e referência.

Anticorpos	Diluição	Controle Positivo	Referência
Anti-GSK3β	1-1500	Carcinoma de cólon	SC-9166
Anti-pGSK3β-Ser9	1-100	Carcinoma de cólon	SC-11757
Anti-AKT total	1-1000	Carcinoma de próstata	Alíquota dada pela UNICAMP
Anti-pAKT1-Thr308	1-250	Carcinoma de cólon	SC-135650
Anti-pAKT1/2/3-Ser473	1-250	Carcinoma de cólon	SC-135651
Anti-pmTOR2448	1-100	Carcinoma de mama	SC-101738

Para o ensaio imuno-histoquímico, cortes teciduais 3 μ m de espessura obtidos do bloco de TMA foram montados em lâminas polarizadas StarFrost® (Knittel Glaser, Brunsique, Alemanha). Os cortes foram desparafinizados em xanol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol. Para a remoção do pigmento formólico os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio 10% em etanol 95%, por 10 minutos, em seguida as lâminas passam por 7 lavagens em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada de acordo com a padronização do laboratório e recomendações dos fabricantes, utilizando solução tampão EDTA (pH 8.0) em Decloaking Chamber™ NxGen (Biocare Medical, Concord, CA, USA) com ciclo de 110°C por 15 minutos. Após o resfriamento e lavagem em 5 banhos de água destilada, os cortes foram submetidos primeiramente, ao bloqueio da biotina endógena com solução de clara de ovo, na proporção de 2 claras de ovo para 200ml de água destilada, essa solução é previamente homogeneizada e filtrada e então incubada com as lâminas a 37°C, por 20 minutos, em seguida é necessário 10 lavagens em água destilada, para retirar todo o excesso da solução. Na sequência, deu-se o bloqueio da avidina endógena através do uso de

leite em pó desnatado Molico®, na proporção de 30g de Molico® desnatado para 180ml de água destilada, a 37°C por 20 minutos, seguido de 10 banhos em água destilada novamente. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com solução de H₂O₂ a 10%, em 3 banhos de 10 minutos cada, após esse bloqueio os cortes foram lavados em 5 banhos de água destilada. Os cortes foram submetidos a 3 banhos de 5 minutos cada em solução tampão TRIS-HCl (pH 7.4). Depois desses passos os cortes estavam prontos para seguirem as incubações com o kit Starr Trek™ Universal HRP Detection System (Referência: STUHRP700, Biocare Medical, Concord, CA, USA), todas as incubações foram realizadas em câmara úmida a 37°C, a primeira solução utilizada foi a solução de bloqueio Background Sniper, por 15 minutos em câmara úmida a 37°C, para bloqueio de ligações inespecíficas, depois desse passo é necessário a retirada do excesso de background das lâminas com auxílio de papel filtro. O próximo passo foi a incubação com os anticorpos primários, o tempo de incubação padronizado para os anticorpos foi de 2 horas a 37°C.

Após esse período de incubação, os cortes foram lavados em solução de TRIS-HCl, em 2 banhos de 2 minutos cada, e então incubados com a solução Trekkie Universal Link (disponível no kit) contendo anticorpo secundário, a 37°C por 20 minutos. Os cortes foram novamente lavados em TRIS-HCl, em 2 banhos de 2 minutos cada, e imersos com a solução contendo o complexo terciário TrekAvidin-HRP (disponível no kit), a 37°C por 10 minutos, seguido de lavagem em TRIS-HCl, em 2 banhos de 2 minutos cada novamente.

A revelação foi realizada com cromógeno 3-3'-diaminobenzidina tetrahidroclorido (DAB) (disponível no kit) por 3 minutos, após esse passo os cortes foram lavados em água corrente e depois contracorados com Hematoxilina de Harris. Os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xiloglutaraldeído e finalmente montados. Os controles positivos estão especificados na Tabela 2 e a omissão dos anticorpos primários foi utilizado como controle negativo.

4.3.1 Avaliação da imuno-histoquímica

Para analisar a expressão das proteínas foi utilizado o método semiquantitativa *Quickscore* (Q), considerando a sua média (MQ) (DETRE; SCLANI; DOWSETT, 1995). Essa análise leva em consideração dois parâmetros, a saber: intensidade e a proporção de células marcadas, os quais foram aplicados para cada *spot* da lâmina do TMA. Cada *spot* do TMA foi dividido em seis campos, aumento de 400X. Ao final o Q obtido por cada

caso/proteína foi dado pela fórmula $Q = P \times I$, tal que P representa a porcentagem de células positivas e I intensidade de marcação (I). A distribuição dos *scores* está detalhada na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição dos *scores* conforme a porcentagem e intensidade de células marcadas.

Variáveis	Classificação					
Score	1	2	3	4	5	6
Porcentagem (P)	0-4%	5-19%	20-39%	40-59%	60-79%	80-100%
Score	0	1	2	3	4	5
Intensidade (I)	Negativo	Fraçao	Moderado	Forte		

4.4 Real Time PCR

4.4.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os iniciadores ou *primers* foram desenhados com o auxílio da ferramenta de *design de primers* da empresa Integrated DNA Technologies (IDT®), através do link *PrimerQuest® Tool*. Os parâmetros escolhidos foram definidos para *qPCR Intercalating Dyes*, levando em consideração os seguintes fatores: temperatura de *melting* de 60°C, porcentagem de bases GC de 50%, tamanho do primer de 18-22pb, tamanho do *amplicon* de 80 a 100pb e energia livre de Gibbs (ΔG) baixa (THORNTON; BASU, 2011). As sequências dos genes alvos foram obtidas pelo site da *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Em seguida, para seleção do melhor primer/gene, utilizou-se o site da IDT® e, finalmente o programa *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, tal que *primers* de menor *expect-value* (e-value) foram finalmente selecionados (THORNTON; BASU, 2011). A Tabela 4 detalha os *primers forward* e *reverse* empregados no estudo de acordo com os parâmetros acima mencionados.

Tabela 4 – Sequência dos primers forward e reverse com suas respectivas referências.

Gene	Sequência	Referência IDT	Referência NCBI
AKT1 F¹	GCTACTTCCTCCTCAAGAATG	128954091	NM_001014431.1
AKT1 R²	GCCACAGAGAACGGTTGA	128954092	NM_001014431.1
AKT2 F	GGGAGACCTTCATCTCTACAA	128954095	NM_001243027.2
AKT2 R	ACCTCAGCCTCCAAGTTA	128954096	NM_001243027.2
AKT3 F	GACCGCACACGTTCTATG	129829704	NM_001206729.1
AKT3 R	CTTGAGATCACGGTACACAATC	129829705	NM_001206729.1

Gene	Sequência	Referência IDT	Referência NCBI
PIK3CA F	AATGAGGCGACCAGATTTC	128954089	NM_006218.2
PIK3CA R	CTGAGGTTCCCTAGTTGATGAG	128954090	NM_006218.2
GSK3β F	CTACCATCCTTATTCCCTCCTCA	128954099	NM_001146156.1
GSK3β R	GTCCACGGTCTCCAGTATTA	128954100	NM_001146156.1
mTOR F	GCCGCATTGTCTCTATCAA	128954097	NM_004958.3
mTOR R	CAATAGGAGGCAGCAGTAAA	128954097	NM_004958.3
B2M F	TATCCAGCGTACTCCAAAGA		NM_004048.2
B2M R	GGATGAAACCCAGACACATAG		NM_004048.2

¹F- *Primer Forward*

²R- *Primer Reverse*

4.4.1 Extração de RNA

As extrações de RNAs de todas as amostras congeladas (mucosa normal e amostra tumoral [PMN e PM]) congeladas foram realizadas no aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) juntamente com o kit de extrações de RNA Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue Kit (Referência: AS1280, Promega, Madison, WI, USA). Todas as etapas seguiram as recomendações do fabricante, bem como todas as soluções utilizadas disponíveis no kit. Em resumo, após a pesagem (máximo de 0,05g), cada amostra foi macerada em ambiente refrigerado em meio contendo 200 µl da solução de trabalho (1mL de solução de homogeneização para cada 20µl de 1-tioglicerol) com auxílio do Pellet Pestles® (Sigma Aldrich). Seguida a aplicação de 200µl de tampão de lise, as amostras foram agitadas em vortex por 15s, centrifugadas a 1000xg por 2 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados (400µl) e colocados nas *cartridges* (suporte disponível no kit), posteriormente foram colocadas dentro do aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) para extração dos RNAs. Ao final, o RNA total eluído de cada amostra foi alíquotado e posteriormente quantificado em espectofotômetro NanoDrop® ND1000, utilizando a relação 260/280 (índice de absorbância variando de 1,6 a 2,1) e 260/230 (índice de absorbância variando de 1,9 a 2,4). Todos os RNAs foram armazenados em freezer -80°C até a transcrição reversa.

4.4.2 Transcrição reversa

Utilizou-se o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Referência: A5001, Promega, Madison, WI, USA) para a síntese de DNA complementar (cDNA). Todas as etapas foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, para cada amostra, 7 μ l de Primer Mix (1 μ l de Oligo DT, 1 μ l de Random Primer e 5 μ l de RNA total foi incubado a 70°C por 5 minutos) e 13 μ l de RT Mix (5 μ l de água livre de RNase, 4 μ l de 5X Reaction Buffer, 1 μ l de dNTP Mix, 1,5 μ l de MgCl₂ (1,5mM), 0,5 μ l de RNAsin e 1 μ l de Enzima RT) foram misturados e incubados em termociclador por 1 hora a 42°C e então por 10 minutos a 70°C para a desnaturação da enzima transcriptase reversa. Ao final, o cDNA/amostra foi alíquotado, quantificado em espectofotômetro NanoDrop® ND1000 (índices de absorbância variando de 1,6 a 2,1 para os índices 260/280 e de 1,9 a 2,1 para os índices 260/230) e armazenado em freezer -20°C até a utilização em PCR em tempo real.

4.4.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real – Real Time PCR

A quantificação da expressão dos genes *PIK3CA*, *GSK3 β* , *AKT1*, *AKT2*, *AKT3* e *mTOR* foram realizados no aparelho StepOnePlus™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) através do método comparativo de *threshold cycles* (Ct). Todos os experimentos realizados foram montados em placas de 96 poços MicroAmp® Fast Optical, 0,1ml (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Para montagem dessas placas de 96 poços, empregou-se o StepOne Software versão 2.1 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Todos experimentos foram conduzidos em duplicata com apenas 1 controle negativo para cada gene. As condições da reação foram determinadas em ciclos previamente padronizados de 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para determinação da curva de *melting*, empregaram-se ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. A reação teve um tempo total de corrida de aproximadamente 2 horas.

Para a reação, utilizou-se o GoTaq® qPCR Master Mix (Referência: A6001, Promega, Madison, WI, USA), que contém sondas com propriedades espectrais semelhante ao SYBR® Green I com excitação a 493nm e emissão a 530nm. As proporções dos reagentes utilizados no mix para cada amostra foram as seguintes: 6 μ l de GoTaq® qPCR Master Mix, 0,5 μ l de *primer forward*, 0,5 μ l de *primer reverse* e 3,1 μ l de água livre de RNase, totalizando 10,1 μ l

de mix em cada poço. A quantidade de cDNA utilizada foi de 1,9 μ l (200ng de cDNA), totalizando em cada poço 12 μ l de solução.

A expressão relativa ótima de cada gene foi estabelecida através da normalização do *Real Time PCR* em relação ao gene endógeno $\beta2$ -*microglobulina* (*B2M*) (do inglês: *housekeeping gene*) (TABELA 4), pois foi o gene que teve os menores índices de variações entre as amostras. O modelo matemático adotado para a avaliação da expressão relativa (*r*) entre o gene alvo e o gene endógeno foi através da diferença entre os valores de Ct do gene endógeno e dos valores de Ct do gene alvo (Δ Ct = Ct do gene alvo - Ct do gene endógeno) sem considerar a correção da eficiência (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). A partir dos valores de Δ Ct dos grupos PM e PNM, foi possível ainda subtrair a variação de Δ Ct das amostras controles através da média do Δ Ct (calibrador) delas, tal que ao final foi obtido o $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct – calibrador. Para as análises dos resultados finais foram considerados a quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta}$ Ct considerando as médias das duplicatas (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; BUSTIN et al., 2009).

4.5 Estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para a definição do teste estatístico empregado na análise da imuno-histoquímica, utilizou-se previamente o teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Para as análises de múltiplas comparações, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn ou *One Way ANOVA*, seguido do pós-teste de Tukey. Para as análises quanto à expressão imuno-histoquímica e expressão relativa dos genes entre os grupos controles e CEB, empregou-se os testes não pareados bicaudais *U* de Mann-Whitney ou teste *t*. Os testes de Pearson ou de Spearman foram usados nas análises de correlações. Para análise de sobrevida, empregou-se a curva de Kaplan-Meier e o teste de *log-rank* de Mantel-Cox para estimar as diferenças entre elas. Alguns dados foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão e outros na forma de média e intervalo de confiança de 95%. Para algumas análises, como em relação aos dados clinicopatológicos, nenhuma análise estatística foi realizada devido ao pequeno tamanho da amostra. Em todas as análises, $p < 0,05$ foi definido como sendo estatisticamente significante.

5 RESULTADOS

5.1 Dados clinicopatológicos gerais

A Tabela 5 mostra as principais características clinicopatológicas dos 90 casos de CEB coletados retrospectivamente a partir dos arquivos de patologia da Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina incluídos no estudo. A maioria era do sexo masculino (75,6%) e idade média de 60 anos, variando de 34 a 99 anos. Com relação à exposição aos dois principais fatores de risco para o CEB, a quase totalidade dos pacientes era de fumantes (90%) e etilistas/ex-etilistas (80%), com média de 25,6 cigarros/dia e 1,1 litros/dia, respectivamente. Quase que a metade dos pacientes tinha história familiar de câncer. Sintomatologia foi observada em mais de 80% deles, sendo dor (35,5%) e disfagia (31,9%) as mais frequentemente reportadas. Outros sintomas relatados, mas em menor proporção, foram trismo, sangramento, xerostomia, ardência, disfonia e dispneia, totalizando 8,4% dos pacientes. Quanto às lesões 84,4% eram ulcerativas, sendo 37 casos (41,1%) localizadas em língua e de dimensões inferiores a 4 cm (43,3%).

Aproximadamente 65% dos pacientes apresentavam evolução superior a três meses e quase 70% deles já se encontravam em estágio avançado (estágio III e IV). Detalhando um pouco mais, destes, 40% dos pacientes se concentraram no estágio IV (n=36), seguido pelo estágio III (n=26, 28,9%), estágio II (n=17, 18,9%) e estágio I (n=9, 10%), sendo que apenas em dois deles (2,2%) nenhuma informação foi obtida. Metástases locorregionais foram observadas em 48 pacientes (53,3%), com apenas dois deles desenvolvendo metástases à distância. Quanto à classificação histológica, dos casos com informações recuperadas, 28% dos tumores foi classificado como bem diferenciado, seguido de moderado/pobremente diferenciado (20%). Embora a maioria dos pacientes foi diagnosticado com doença em estágio avançado, mais da metade deles não desenvolveu recidiva (53%), sendo isso observado em apenas 22% dos casos.

Quanto ao tratamento empregado, a combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia (terapia trimodal) foi a mais empregada (31 pacientes, 34,4%), seguido por radio e quimioterapia (n=21, 23%) e cirurgia associada à radioterapia (n=13, 14%). Além disso, cirurgia e radioterapia como única forma de tratamento ocorreu em 13 (14%) e 10 (11%) casos, 2 (3,6%) casos não tinham essa informação. Em relação ao tipo de radioterapia usada no tratamento dos pacientes, cobaltoterapia foi a mais empregada (n=55, 61%), seguido

por acelerador linear (n=12, 13,5%). Sobre a quimioterapia, as drogas mais utilizadas foram dexametasona, manitol, cisplatina e ondansetrona em associação. O tempo de acompanhamento médio dos 90 pacientes foi de 24,5 meses, com mínimo de 1 mês e máximo de 128 meses. Para os casos PNM, o tempo médio de acompanhamento foi de 25,2 meses, com mínimo de 1 mês e máximo de 79 meses. Para os casos PM, o tempo médio de acompanhamento foi de 23,9 meses, com mínimo de 1 mês e máximo de 128 meses. Quanto à condição clínica dos pacientes ao final do estudo, 41,1% dos casos evoluíram para óbito e os demais ou se encontravam vivos sem doença (34,4%) ou com doença primária e/ou metástases (24,4%).

Tabela 5 – Distribuição dos 90 pacientes com CEB quanto aos dados clinicopatológicos.

Variáveis	Classificação	Nº de pacientes	Porcentagem (%)
Sexo	Feminino	22	24,4
	Masculino	68	75,6
Idade	≤ 55	43	47,8
	> 55	47	52,2
Tabagismo	SIM	81	90,0
	NÃO	7	7,8
	¹ SI	2	2,2
Etilismo	SIM	71	78,9
	NÃO	16	17,8
	SI	3	3,3
Histórico de Câncer Familiar	SIM	41	45,6
	NÃO	40	44,4
	SI	9	10,0
Sintomatologia	SIM	75	83,3
	NÃO	11	12,2
	SI	4	4,4
Localização	Língua	37	41,1
	Assoalho	25	27,8
	Outros	28	31,1
Tamanho	≤ 4 cm	39	43,3
	> 4 cm	37	41,1
	SI	14	15,6
Evolução	≤ 3m	28	31,1
	> 3 < 6m	7	7,8
	≥ 6m	51	56,7
	SI	4	4,4
Estágio	Inicial	27	30,0
	Avançado	61	67,8
	SI	2	2,2

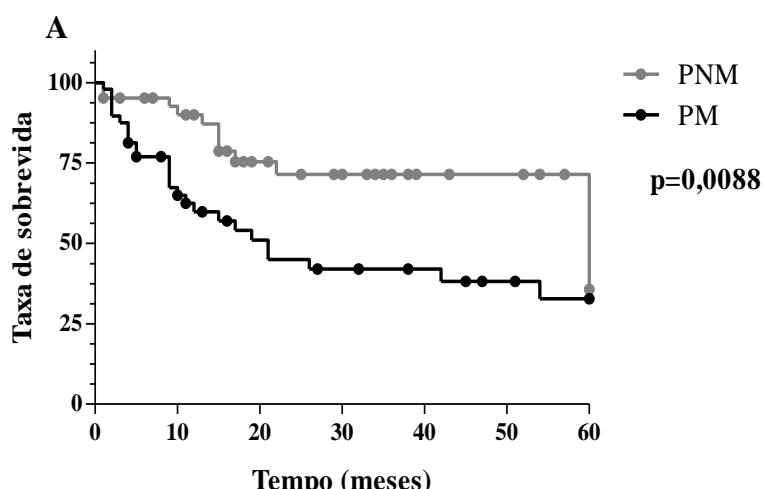
Variáveis	Classificação	Nº de pacientes	Porcentagem (%)
Metástase	SIM	48	53,3
	NÃO	42	46,7
Classificação Histológica	² BD	25	27,8
	³ MD/PD	18	20,0
	SI	47	52,2
Recidiva	SIM	20	22,2
	NÃO	48	53,3
	SI	22	24,4
Condição Clínica	⁴ VSD	31	34,4
	⁵ VCDP	19	21,1
	⁶ VCDM	3	3,3
	Óbito	37	41,1

¹SI: sem informação; ²BD: bem diferenciado; ³MD/PD: moderadamente diferenciado/pobremente diferenciado;

⁴VSD: vivo sem doença; ⁵VCDP: vivo com doença primária; ⁶VCDM: vivo com doença metastática.

5.2 Análise de sobrevida

Quanto a análise de sobrevida de cinco anos dos 90 pacientes, foi observado uma diferença estatisticamente significante para estadiamento (inicial *vs* avançado) e metástases (presença *vs* ausência) (FIGURA 8). Para os demais dados clinicopatológicos, como tempo de evolução da doença ($p=0,0642$), grau de diferenciação tumoral ($p=0,8995$), recidiva ($p=0,8552$), idade menor ou maior que 55 anos ($p=0,8588$) nenhuma diferença estatisticamente significante foi encontrada.



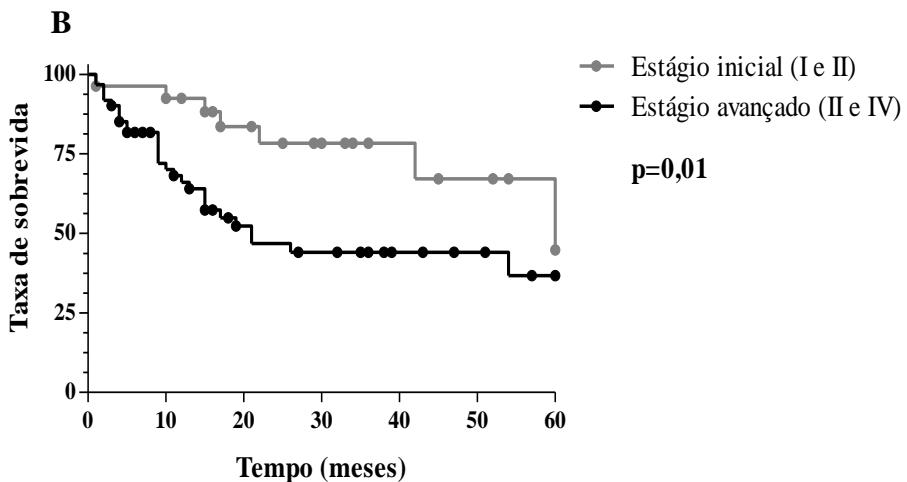


Figura 8 - Curvas de Kaplan-Meier para tempo de sobrevida 5 anos dos 90 pacientes com CEB. Em A, tem-se a análise de sobrevida quanto à presença ou não de metástase. Em B, quanto ao estágio inicial ou avançado dos pacientes. Os resultados foram analisados pelo teste de Mantel-Cox.

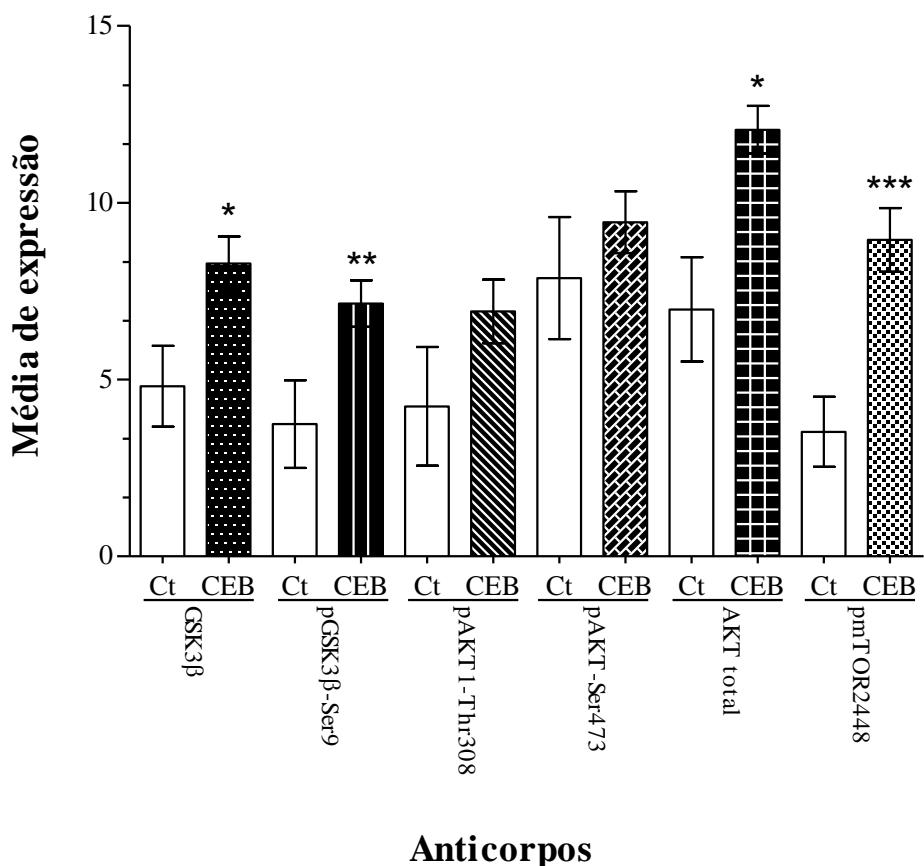
5.3 Análise imuno-histoquímica

5.3.1 Análise geral da expressão das proteínas nos CEB e grupo controle

O número de amostras analisadas para cada anticorpo investigado variou e as razões disso foram desde ausência do *spot* no TMA como também ausência de tumor dentro do *spot*. No geral, a expressão imuno-histoquímica de todas as proteínas investigadas foi observada tanto no núcleo quanto no citoplasma das células tumorais, o mesmo sendo observado no controle. Quanto à intensidade de marcação, ela variou de negativo a forte para todas as proteínas estudadas, especialmente no grupo experimental. No caso do grupo controle, a intensidade foi predominantemente fraca e envolveu as camadas basal, parabasal e espinhosa. Quanto ao estroma, pôde-se notar que para as proteínas GSK3 β , pmTOR2448 e AKT total a expressão em células estromais foi frequentemente observada tanto no grupo controle quanto no experimental, o que é esperado devido a natureza ubíqua dessas proteínas. Para algumas proteínas, como a GSK3 β , pGSK3 β -Ser9 e pAKT1-Thr308, a MQ citoplasmática foi significativamente maior quando comparada com a MQ nuclear, enquanto que para a AKT total foi o inverso. Para a pmTOR2448 e pAKT-Ser473 nenhuma diferença entre os dois compartimentos foi encontrada.

Comparando a expressão dessas proteínas entre o grupo controle e com CEB, os dados estão discriminados na Figura 9 e as imagens correspondentes na Figura 10. Para a proteína GSK3 β , analisou-se 87/90 casos. A MQ dos pacientes com CEB e controle foi de 8,2 e 4,8,

respectivamente, sendo $p=0,04$. Para a pGSK3 β -Ser9, 86/90 casos foram analisados e a MQ desse grupo foi de 7,1 e do grupo controle de 3,7, sendo essa diferença estatisticamente significante ($p=0,002$). Setenta e nove pacientes foram analisados para a proteína AKT e a MQ encontrada foi de 12,0, enquanto que no grupo controle a MQ foi de 6,9, com $p=0,01$. Quanto à proteína pAKT1-Thr308, 83/90 casos foram analisados e a MQ foi de 6,9; para o grupo controle, a MQ foi menor. Em relação à pAKT-Ser473, 73/90 casos foram avaliados e a MQ do grupo foi de 9,4, ao passo que o MQ do grupo controle foi de 7,8. Nos dois casos anteriores, essas diferenças não foram estatisticamente significantes. Por fim, a proteína p-mTOR2448 foi avaliada em 81/90 pacientes e a MQ desse grupo foi muito superior ao do grupo controle (8,9 vs 3,5), com $p=0,0007$.



Anticorpos

Figura 9 – Expressão imuno-histoquímica de cada proteína em relação aos grupos controles e o grupo de CEB. Para GSK3 β , pGSK3 β -Ser9, pAKT1-Thr308, AKT total e pmTOR2448, empregou-se o teste t não pareado bicaudal e para AKT total o teste U de Mann-Whitney. Dados expressos como média e intervalo de confiança de 95% para todas as proteínas. Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,0001$).

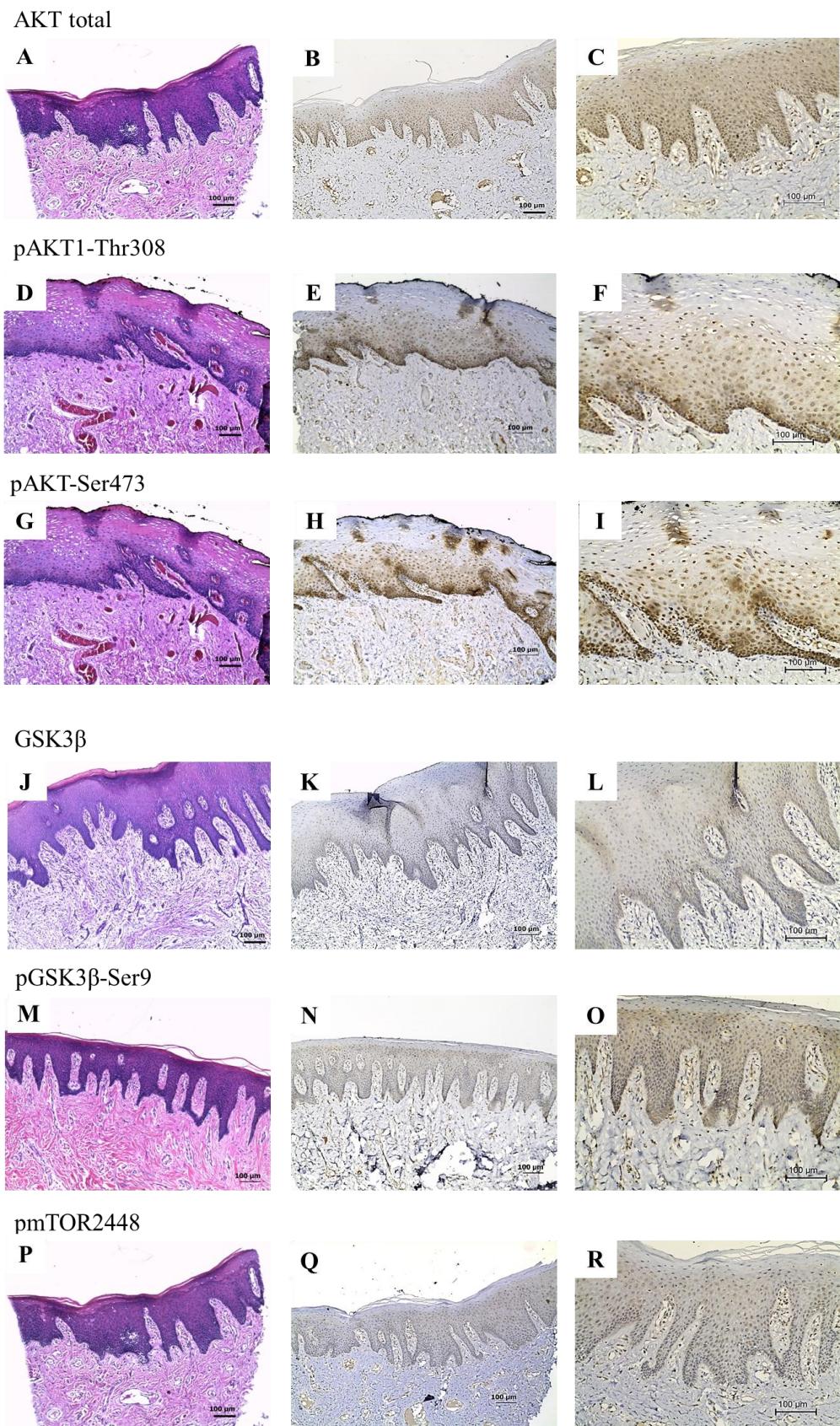


Figura 10 – Controles constituídos de epitélio normal corados em H&E e as respectivas reações imuno-histoquímicas de todas as proteínas investigadas. Hematoxilina e Eosina (aumento original 100X e 200X).

5.3.2 Expressão das proteínas em relação às variáveis clinicopatológicas gerais

Os parâmetros clinicopatológicos avaliados foram: sexo, idade, etilismo, histórico familiar de câncer, sintomatologia, evolução, localização, tamanho, estágio, metástase, grau de diferenciação histopatológico, recidiva, condição clínica e sobrevida. O parâmetro tabagismo não foi considerado devido a um número amostral baixo de pacientes não fumantes. Como pode ser observado na Tabela 6, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para as variáveis história familiar de câncer para as proteínas AKT total e pAKT1-Thr308, gênero, localização e graduação histológica para a proteína pAKT-Ser473 e, finalmente, metástase e localização para GSK3 β e pGSK3 β -Ser9, respectivamente.

Tabela 6 - Expressão das proteínas e a associação com as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas dos 90 pacientes com CEB.

Variáveis	N ^{1º}	Proteínas									
		AKT total n ² (m ± DP) ³	P	pAKT1-Thr308 n(m ± DP)	P	pAKT-Ser473 n(m ± DP)	P	pmTOR2448 n(m ± DP)	P	GSK3b n(m ± DP)	P
Sexo											
Masculino	68	60 (12,3 ± 2,7)	NS	65 (7,4 ± 4,0)	NS	58 (10,0 ± 3,2)	0,007	64 (9,0 ± 4,2)	NS	68 (9,4 ± 3,5)	NS
Feminino	22	22 (11,2 ± 3,4)		21 (5,6 ± 3,9)		18 (7,4 ± 4,3)		20 (9,7 ± 3,6)		22 (7,5 ± 3,4)	22 (6,2 ± 2,6)
Idade											
≤55	43	32 (11,8 ± 2,4)	NS	36 (7,2 ± 4,2)	NS	31 (8,9)	NS	36 (9,1 ± 3,7)	NS	39 (8,3 ± 3,5)	37 (7,2 ± 3,2)
>55	47	45 (12,3 ± 3,2)		45 (6,8 ± 4,0)		40 (9,8)		43 (8,9 ± 4,2)		46 (8,1 ± 3,3)	47 (6,9 ± 2,8)
Etilismo											
Sim	71	61 (12,1 ± 2,8)	NS	66 (7,5 ± 4,0)	NS	58 (9,9 ± 3,3)	NS	66 (9,1 ± 4,2)	NS	69 (8,4 ± 3,6)	68 (7,4 ± 3,2)
Não	16	16 (11,9 ± 3,7)		15 (4,2 ± 3,7)		14 (7,5 ± 4,7)		14 (7,8 ± 3,4)		16 (7,6 ± 3,6)	16 (6,1 ± 2,4)
⁵HF Câncer											
Sim	41	34 (12,9 ± 2,7)	0,03	36 (7,7 ± 4,0)	0,03	30 (10,3)	NS	36 (8,8 ± 4,6)	NS	39 (8,6 ± 3,5)	38 (7,1 ± 3,1)
Não	40	37 (11,4 ± 3,1)		38 (5,7 ± 4,1)		35 (8,7)		37 (8,9 ± 3,8)		39 (8,3 ± 3,7)	39 (6,9 ± 3,0)
Sintomatologia											
Presente	75	68 (12,1 ± 2,8)	NS	72 (7,0 ± 4,0)	NS	62 (9,3)	NS	71 (8,9 ± 4,0)	NS	76 (8,1 ± 3,5)	75 (7,2 ± 3,1)
Ausente	11	11 (11,8 ± 3,9)		11 (6,2 ± 4,7)		11 (10,1)		10 (9,1 ± 4,2)		11 (8,8 ± 3,6)	11 (6,7 ± 2,4)
Evolução											
≤3 meses	28	23 (11,6)	NS	25 (6,5 ± 4,2)	NS	23 (9,0 ± 4,2)	NS	24 (9,3 ± 3,9)	NS	26 (7,7 ± 3,6)	26 (7,0)
>3 meses	58	52 (12,2)		54 (7,1 ± 4,0)		46 (9,5 ± 3,6)		53 (8,5 ± 4,1)		57 (8,3 ± 3,4)	56 (7,1)
Localização											
Língua	37	35 (11,4 ± 3,3)		34 (6,4 ± 3,8)		32 (8,2 ± 4,2)		33 (9,1 ± 4,2)		36 (8,2 ± 3,6)	36 (6,4 ± 2,2)a
Assoalho	25	21 (12,8 ± 2,0)	NS	23 (6,9 ± 3,9)	NS	18 (10,5 ± 3,0)	0,03	24 (8,0 ± 4,2)	NS	23 (8,2 ± 4,0)	21 (6,5 ± 3,4)
Outra	28	23 (12,1 ± 3,0)		26 (7,4 ± 4,6)		22 (10,4 ± 3,0)		24 (9,5 ± 3,9)		28 (8,3 ± 3,2)	28 (8,5 ± 3,3)b

Tamanho												
≤4cm	39	37 (12,1)	NS	37 (6,2 ± 3,6)	NS	32 (9,2 ± 4,0)	NS	36 (9,0 ± 3,9)	NS	39 (8,2 ± 3,5)	NS	38 (7,3)
>4cm	37	31 (11,7)		33 (7,7 ± 4,6)		29 (9,8 ± 3,7)		32 (8,5 ± 4,3)		35 (8,4 ± 3,5)		35 (6,9)
Estágio												
Inicial	27	23 (12,0)	NS	25 (5,7 ± 3,6)	NS	23 (8,8 ± 4,2)	NS	24 (9,1 ± 3,2)	NS	27 (7,9 ± 3,4)	NS	26 (7,5)
Avançado	61	55 (12,0)		57 (7,3 ± 4,2)		49 (9,7 ± 3,5)		56 (8,8 ± 4,4)		59 (8,4 ± 3,6)		59 (6,9)
Metástase												
Presente	48	40 (12,0)	NS	44(6,9 ± 4,2)	NS	37 (10,0 ± 3,4)	NS	43 (9,2 ± 4,6)	NS	46 (9,1 ± 3,8)	0,01	46 (7,6 ± 3,6)
Ausente	42	39 (12,0)		39 (6,9 ± 4,0)		36 (8,8 ± 4,0)		38 (8,5 ± 3,3)		41 (7,2 ± 3,0)		40 (6,5 ± 2,1)
6. Histológica												
BD	25	19 (12,8 ± 2,6)	NS	23 (7,0 ± 4,1)	NS	21 (8,7 ± 4,2)	0,04	23 (8,5 ± 4,4)	NS	24 (7,6 ± 4,3)	NS	24 (7,8 ± 4,1)
MD/PD	18	16 (13,2 ± 2,7)		17 (8,0 ± 4,9)		13 (11,5 ± 3,3)		17 (10,8 ± 4,8)		18 (9,8 ± 3,5)		28 (7,0 ± 3,3)
Recidiva												
Não	48	44 (12,4 ± 2,6)	NS	45 (7,0 ± 5,6)	NS	38 (10,0)	NS	44 (8,9 ± 4,3)	NS	46 (9,2)	NS	47 (6,9)
Sim	20	17 (12,8 ± 2,1)		17 (8,0 ± 2,3)		16 (9,0)		17 (9,1 ± 3,4)		19 (7,9)		18 (8,4)
7. Cond. Clínica												
VSD	31	29 (11,6)		29 (6,0 ± 3,9)		26 (9,3)		29 (8,8 ± 2,9)		31 (8,2 ± 3,2)		30 (6,5)
VCD	19	18 (12,5)	NS	18 (7,4 ± 4,6)	NS	16 (9,4)	NS	16 (8,5 ± 5,1)	NS	18 (8,4 ± 4,0)	NS	18 (7,3)
Óbito	37	29 (12,4)		33 (7,5 ± 4,0)		28 (9,9)		33 (9,3 ± 4,5)		35 (8,2 ± 3,8)		35 (7,7)

1: N- número de pacientes com informações coletadas; 2: n- número de pacientes analisados; 3: m ± DP = média *quickscore* ± desvio padrão; 4: NS – não significativo; 5: HF- história familiar; 6: G- graduação; BD: bem diferenciado; MD; moderadamente diferenciado; PD: pobramente diferenciado; 7: Cond- condição; VSD: vivo sem doença; VCD: vivo com doença. Os dados em negrito significam o uso de teste estatístico não paramétrico não pareado bicaudal *U* Mann Whitney (2x2) ou Teste de Kruskal-Wallis (3x3), com post-teste de Dunn. Para os demais cruzamentos foi aplicado o Teste *t* não pareado bicaudal ou *One Way* ANOVA para múltiplas comparações, com pós-teste de Tukey.

5.3.3 Expressão das proteínas entre os grupos PNM, PM e grupo controle

No geral, a MQ das proteínas foi sempre maior no grupo PM em comparação aos grupos PNM e controle, exceto para a proteína pAKT1-Thr308, cuja MQ foi exatamente a mesma entre os grupos PNM e PM ($MQ=6,9$), mas ainda maior em relação ao grupo controle ($MQ=4,2$). Numa análise mais detalhada, as MQ entre o grupo controle e PNM e entre o grupo controle e PM foram estatisticamente significantes para as proteínas AKT total, pGSK3 β -Ser9 e pmTOR2448 (FIGURA 11A, E e F). Diferente disso, nenhuma significância foi obtida para as proteínas pAKT1-Thr308 e pAKT-Ser473 (FIGURA 11B e C). Interessante foi o fato de que a MQ da proteína GSK3 β foi estatisticamente significante não apenas entre o grupo controle (4,8) e PNM (7,2) e PM (9,1), mas também entre PNM e PM, sugerindo que a expressão dessa proteína pode estar associada com o desenvolvimento de metástase (FIGURA 11D). A reação imuno-histoquímica nos *spots* do TMA para os grupos PM e PNM foram ilustrados nas Figuras 12 e 13.

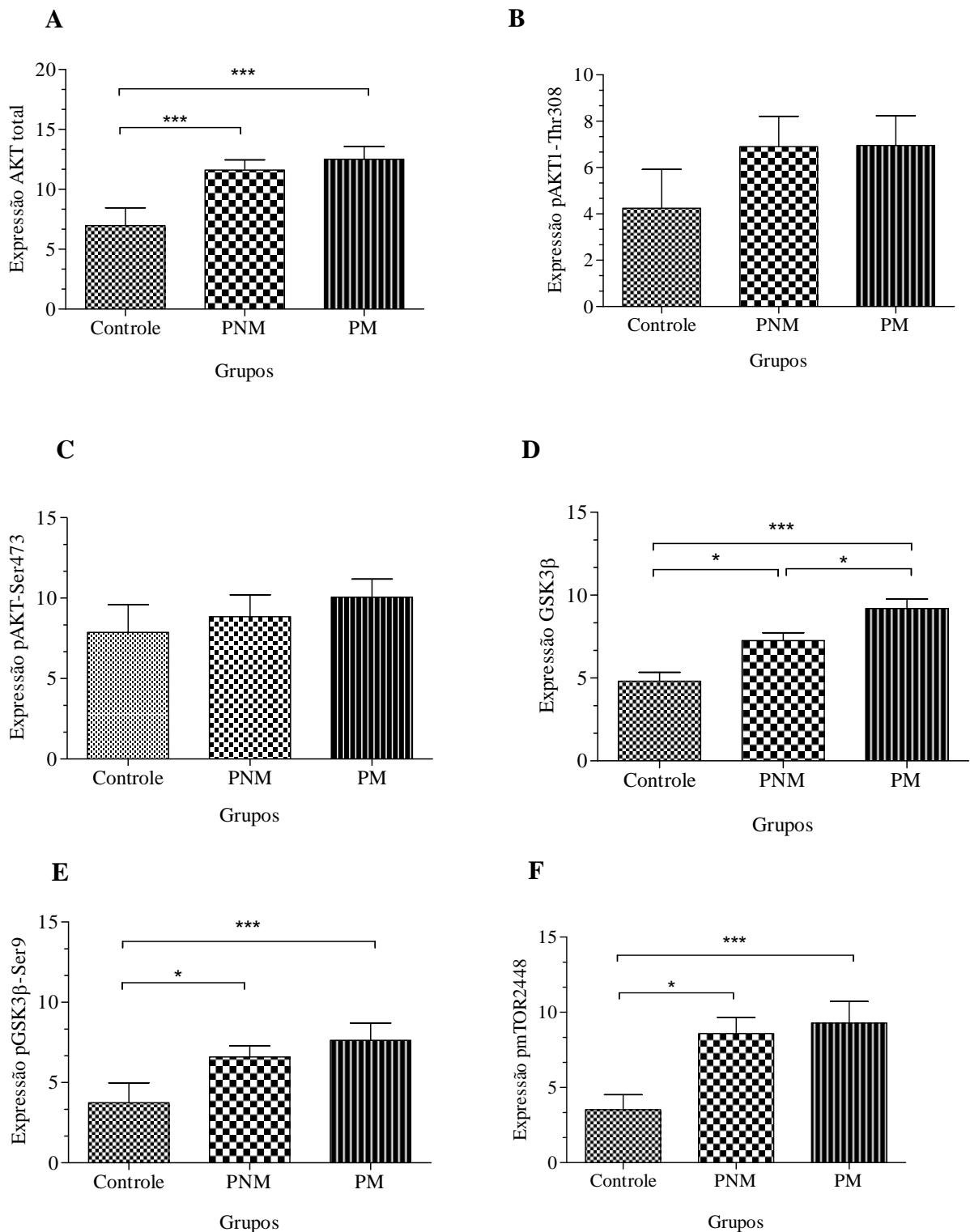
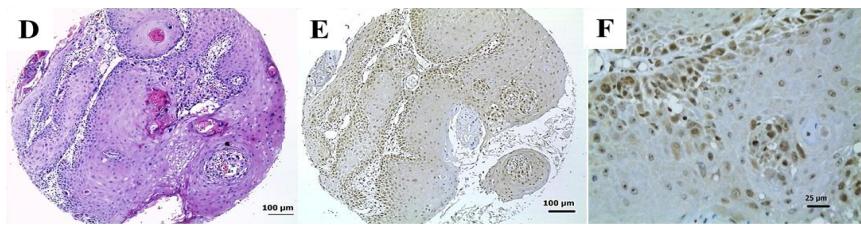


Figura 11 - Expressão imuno-histoquímica das proteínas em relação aos grupos controle, PNM e PM. De B a F, utilizou o teste *One Way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, e em A o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Os dados são apresentados na forma de médias e intervalo de confiança de 95%. Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$).

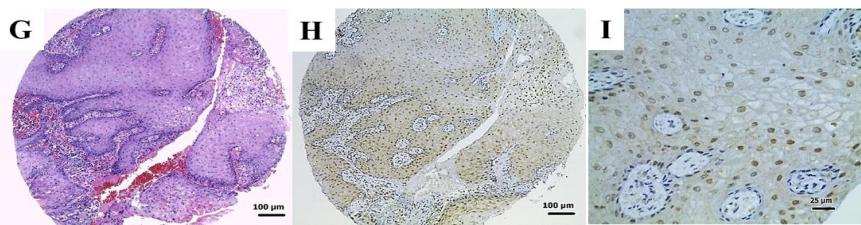
PNM AKT total



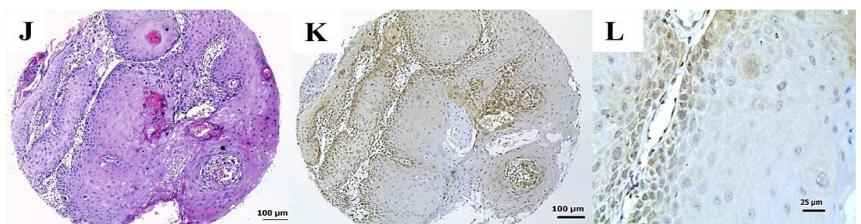
PNM pAKT -Ser473



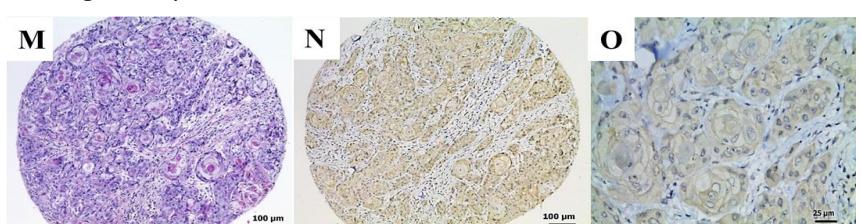
PNM pAKT1-Thr308



PNM GSK3β



PNM pGSK3β-Ser9



PNM pmTOR2448

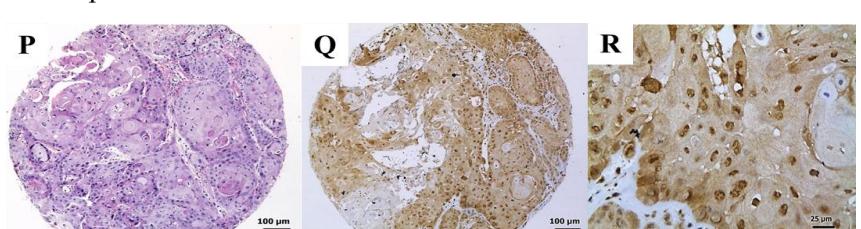
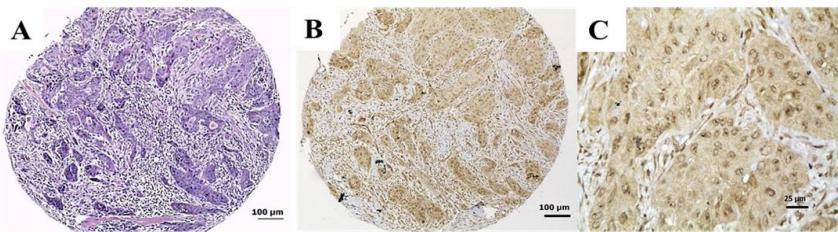
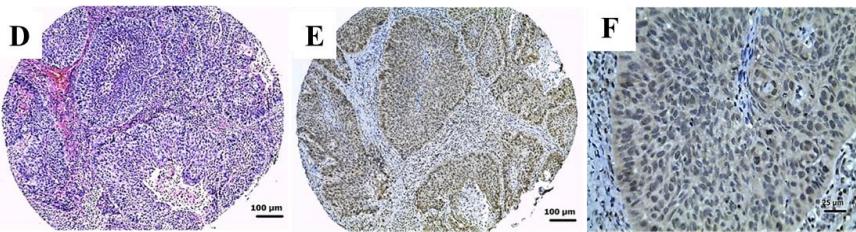


Figura 12 – Cortes histológicos dos *spots* do TMA corados em H&E e as respectivas reações imuno-histoquímicas do grupo PNM (aumento original de 100X e 400X).

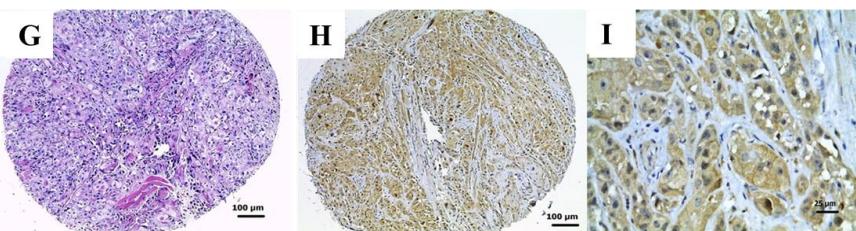
PM AKT total



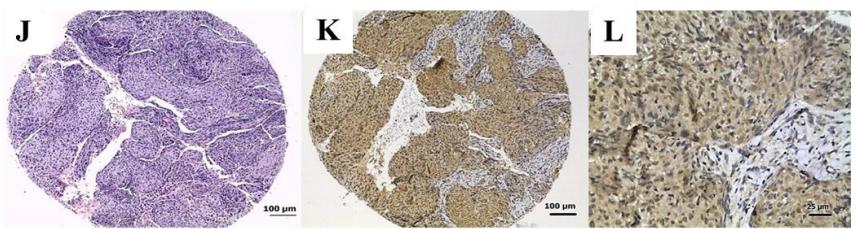
PM pAKT-Ser473



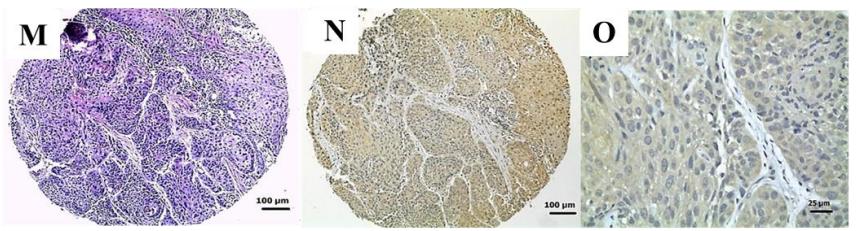
PM pAKT1-Thr308



PM GSK3β



PM pGSK3β-Ser9



PM pmTOR2448

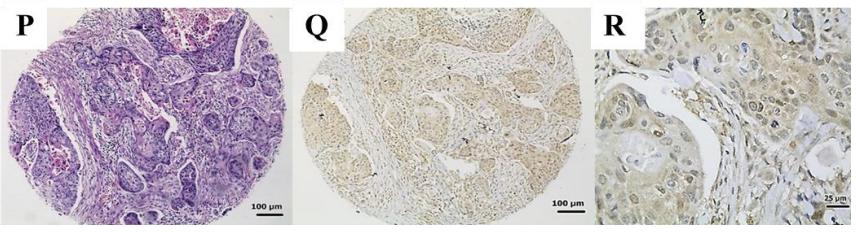


Figura 13 – Cortes histológicos dos *spots* do TMA corados em H&E e as respectivas reações imuno-histoquímicas do grupo PM (aumento original de 100X e 400X).

5.3.4 Correlação geral entre as proteínas estudadas

A Figura 14 mostra as análises de correlação entre as proteínas estudadas. Como mostrado, uma correlação estatisticamente significante entre AKT total e GSK3 β foi observada (FIGURA 14A). Além disso, as formas fosforiladas da proteína AKT, as quais podem fosforilar mTOR no sítio 2448, bem como também podem inativar a proteína GSK3 β , através da fosforilação do sítio Ser9, mostraram uma significante correlação (FIGURAS 14B, C, D, E), indicando que a via PI3K-Akt está ativa nas amostras de CEB estudadas. Separando entre os grupos PNM e PM, as mesmas correlações foram observadas (dados não mostrados).

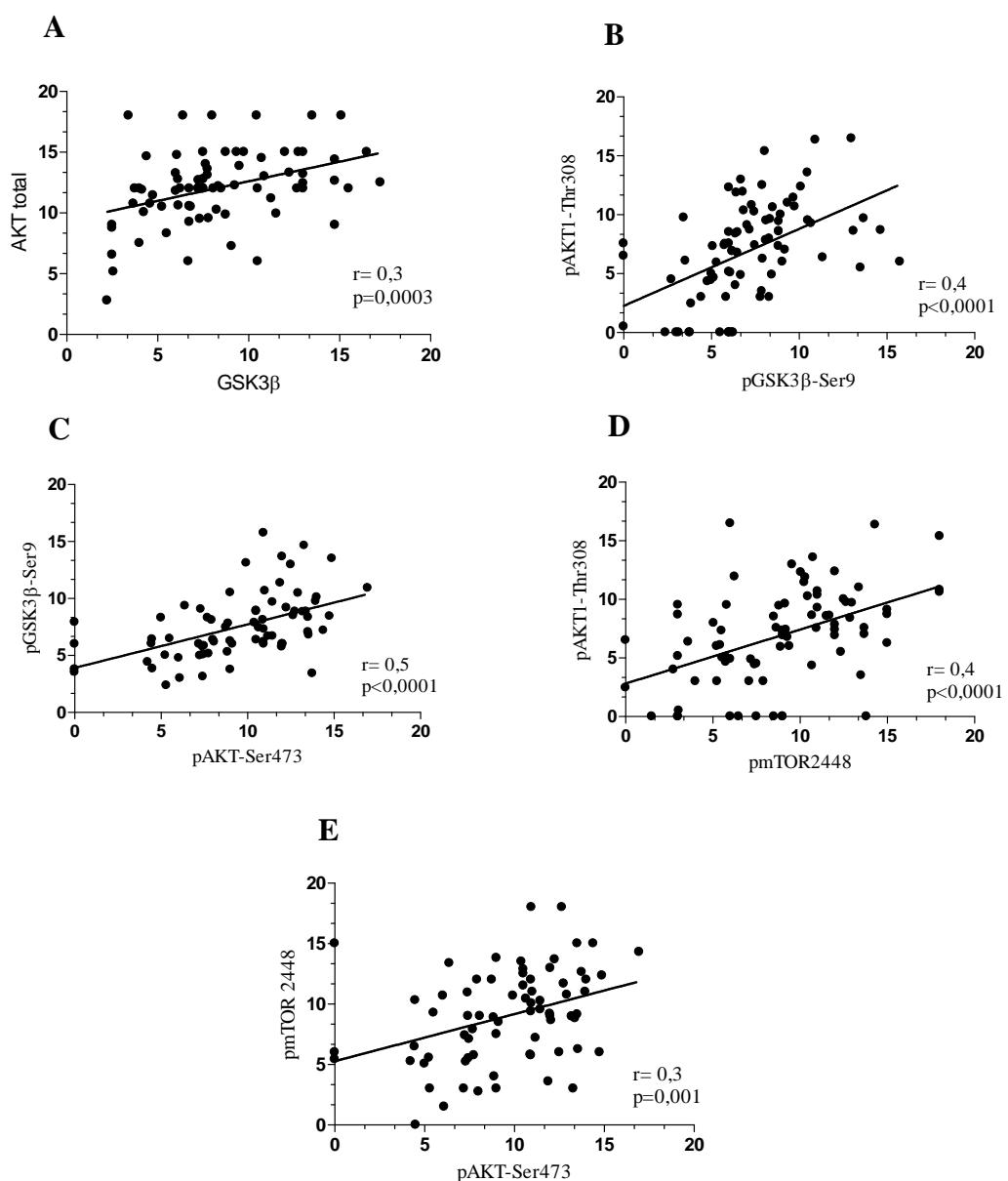


Figura 14 – Análise de correlação entre as proteínas estudadas (coeficiente de variação = r).

5.3.5 Análise da expressão das proteínas entre os grupos PNM e PM e associação com variáveis clinicopatológicas

As Tabelas 7 e 8 detalham a associação entre a expressão das proteínas com as variáveis clinicopatológicas entre os grupos PNM e PM. Como será notado, algumas análises não foram feitas devido ao reduzido tamanho amostral. A expressão de GSK3 β entre os grupos PNM e PM foi significantemente associada com as variáveis sexo, etilismo, história familiar de câncer e localização, enquanto que a AKT total estava associada apenas com história familiar de câncer. Para as demais proteínas nenhuma associação foi encontrada.

Tabela 7 – Expressão imuno-histoquímica das proteínas em relação aos dados clinicopatológicos entre os grupos PNM e PM.

Variáveis	Proteínas								
	AKT total ¹ n(² média)		P	pAKT1-Thr308 n(média)		P	pAKT-Ser473 n(média)		
	PNM	PM		PNM	PM		PNM	PM	
Sexo									
Feminino	13(10,2)	9(12,5)	³ NS	12(6,3)	9(4,7)	NS	11(7,3)	7(7,4)	
Masculino	29(12,2)	31(12,5)		30(7,3)	35(7,5)		28(9,4)	30(10,6)	
Idade									
≤55	15(11,4)	19(12,1)	NS	16(6,7)	20(7,5)	NS	15(7,6)	16(10,1)	
>55	24(11,7)	21(12,9)		23(6,9)	22(6,6)		21(9,6)	19(10,0)	
Etilismo									
Sim	29(11,9)	32(12,2)	NS	⁴ AI		AI	AI		
Não	8 (10,1)	8(13,6)							
⁵HF de Câncer									
Sim	15(11,6)	19(13,9)a	0,04	15(6,9)	21(8,3)	NS	13(10,1)	17(10,5)	
Não	17(11,8)	20(11,1)b		17(6,2)	21(5,3)		17(7,9)	18(9,5)	
Localização									
Língua	15(11,0)	20(12,6)	NS	14(5,6)	20(7,0)	NS	AI		
Assoalho	12(12,9)	9(12,2)		13(6,4)	10(7,7)		AI		
Outra	12(10,9)	11(13,6)		12(8,8)	14(6,3)				
Tamanho									
≤ 4cm	21(11,7)	14(12,3)	NS	21(5,6)	16(7,0)	NS	19(8,2)	13(10,5)	
> 4cm	11(11,5)	20(11,9)		11(8,4)	22(7,3)		11(10,2)	18(9,5)	
⁶Cond. Clínica									
VSD	15(11,0)	20(11,8)	NS	13(5,6)	20(7,0)	NS	18(9,2)	8(9,4)	
VCD	12(12,9)	7(12,8)		13(6,4)	8(8,6)		9(8,7)	7(10,4)	
Óbito	12(10,9)	12(13,2)		12(8,8)	15(6,4)		7(8,5)	21(10,3)	

1: n- número de pacientes analisados; 2: m - média *quickscore*; 3: NS - não significativo; 4: AI - amostras insuficientes para análise; 5: HF- história familiar; 6: Cond- condição; VSD: vivo sem doença; VCD: vivo com doença. Os dados em negrito significam que os dados são não paramétricos e os testes aplicados foram o teste não pareado bicaudal U Mann Whitney ou Teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. Para os demais cruzamentos foi aplicado o Teste *t* não pareado bicaudal ou para múltiplas comparações *One Way ANOVA* com pós-teste de Tukey.

Tabela 8 – Expressão imuno-histoquímica das proteínas em relação aos dados clinicopatológicos entre os grupos PNM e PM.

Variáveis	pmTOR2448 ¹n (²média)		P	Proteínas GSK3b n(média)		P	pGSK3b-Ser⁹ n(média)		P
	PNM	PM		PNM	PM		PNM	PM	
Sexo									
Feminino	11(9,0)	9(8,4)	³NS	13(5,9)c	9(9,9)d	0,01	13(6,5)	9(5,6)	NS
masculino	30(8,4)	34(9,4)		31(7,7)	37(9,0)e		30(6,7)	37(8,1)	
Idade									
<55	17(8,7)	19(9,4)	NS	17(7,2)	22(9,1)	NS	16(6,4)	21(7,9)	NS
>55	21(8,4)	22(9,4)		24(7,2)	22(9,2)		24(6,6)	23(7,2)	
Etilismo									
Sim	⁴AI			31(7,7)	38(9,0)	0,03			
Não				8(5,6)	8(9,7)				
⁵HF de Câncer									
Sim	16(7,9)	20(9,4)	NS	17(6,6)f	22(10,2)g	0,02	16(6,3)	22(7,7)	NS
Não	16(9,0)	21(8,8)		17(8,1)	22(8,4)		17(6,8)	22(7,0)	
Localização									
Língua	13(8,9)	20(9,2)	NS	15(6,0)h	21(9,7)i		14(6,2)	21(6,6)	NS
Assoalho	14(7,7)	10(8,6)		13(8,6)	10(7,7)	0,02	13(6,5)	10(6,6)	
Outra	11(9,2)	13(9,7)		13(7,2)	15(9,3)		12(7,0)	15(9,6)	
Tamanho									
< 4cm	20(8,2)	16(10,0)	NS	23(7,3)	16(9,6)	NS	22(6,4)	16(8,7)	NS
> 4cm	11(8,7)	21(8,3)		11(9,6)	24(8,9)		11(6,9)	24(6,9)	
⁶Cond. Clínica									
VSD	18(8,4)	11(9,5)	NS	20(7,3)	11(9,7)	NS	19(6,7)	11(6,0)	NS
VCD	8(8,6)	8(8,4)		9(7,6)	9(9,1)		9(6,7)	9(7,8)	
Óbito	11(9,2)	23(9,4)		10(6,4)	25(8,8)		10(6,4)	25(8,2)	

1: n- número de pacientes com informações coletadas; 2: m = média *quickscore*; 3: NS- não significativo; 4: AI- amostras insuficientes para análise; 5: HF- história familiar; 6: Cond- condição; VSD: vivo sem doença; VCD: vivo com doença. Os dados em negrito significam que os dados são não paramétricos e os testes aplicados foram o teste não pareado bicaudal U Mann Whitney ou Teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. Para os demais cruzamentos foi aplicado o Teste *t* não pareado bicaudal ou para múltiplas comparações One Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

5.4 Expressão gênica

Os dados referentes a avaliação quantitativa dos genes (expressão relativa) *AKT1*, *AKT3*, *PIK3CA*, *GSK3β* e *mTOR* entre o grupo controle e o grupo de pacientes com CEB podem ser observados na Figura 15. O gene *AKT2* não pode ser avaliado devido ao alto coeficiente de variação entre as amostras. No geral, a expressão relativa dos genes *AKT1*, *PIK3CA* e *mTOR* foi maior no grupo controle do que no grupo CEB. Em contraste, a expressão relativa dos genes *GSK3β* e *AKT3* foi maior no grupo CEB do que no controle. Contudo, em nenhuma caso, uma diferença estatisticamente significante foi encontrada.

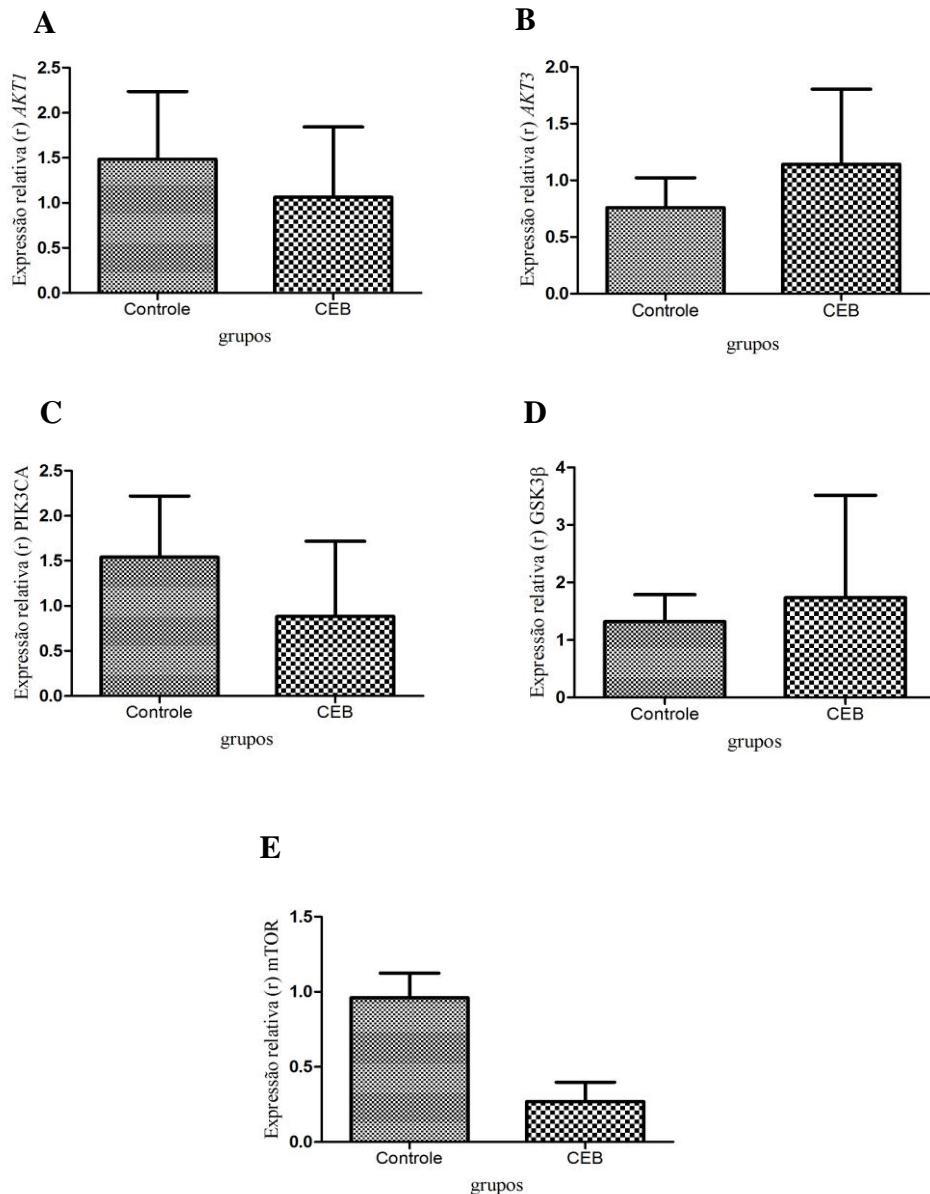


Figura 15 – Expressão relativa dos genes *AKT1*, *AKT3*, *PIK3CA*, *GSK3β* e *mTOR* nos grupos controle e CEB. De A-D foi utilizado o teste t não pareado bicaudal e em E teste não pareado bicaudal U Mann Whitney. Dados expressos como média ± desvio padrão.

A análise comparativa da expressão relativa entre os grupos controle e PNM e PM estão expressos no Figura 16. Interessante notar que a expressão dos genes foi variável entre os grupos, sendo que em alguns casos uma maior expressão gênica foi observada no grupo controle (*PIK3CA*, *AKT1*), enquanto que outros genes (*AKT3* e *GSK3β*) a expressão no controle foi menor. Outro ponto a ser destacado é o fato que, de todos os genes investigados, o *GSK3β* foi o que apresentou a maior média de expressão sendo isso observado no grupo PNM. No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significante foi encontrada entre os

grupos controle, PM e PNM para todos os genes, exceto para o *mTOR*, cuja expressão no grupo controle foi maior quando comparado com os grupos PNM e PM ($p<0,001$).

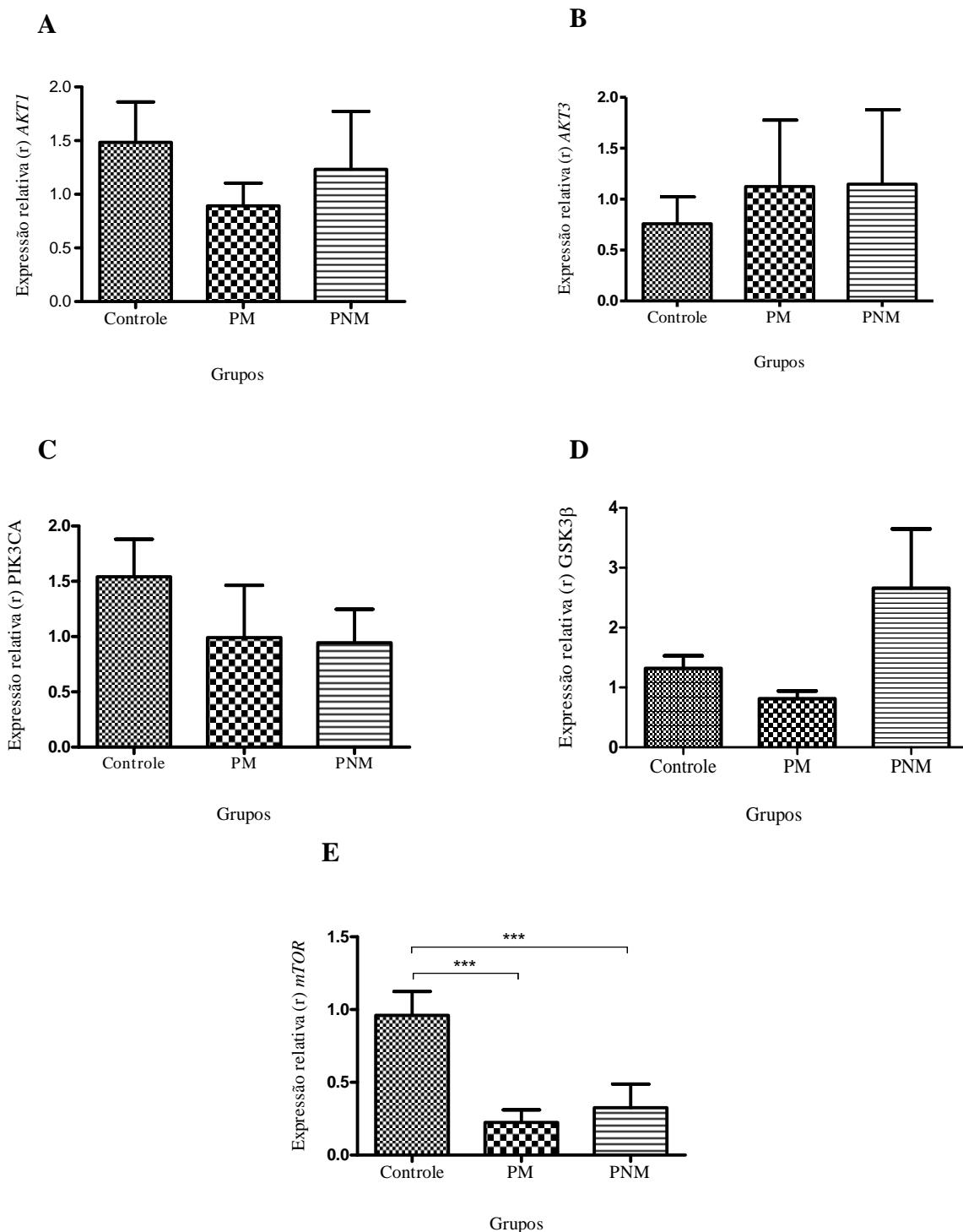


Figura 16 – Expressão relativa dos genes *AKT1*, *AKT3*, *PIK3CA*, *GSK3β* e *mTOR* nos grupos controle, PNM e PM. De A-E foi usado o teste *t* não pareado bicaudal. Dados expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos (*** $p<0,001$).

6 DISCUSSÃO

Esse estudo teve como foco principal avaliar o papel da via de sinalização PI3K-Akt e a sua relação com fatores sociodemográficos e clinicopatológicos de uma amostra de CEB obtida retrospectivamente dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia e Anatomia-Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia. Numa análise geral sobre a caracterização da amostra investigada, pode-se dizer que os dados sociodemográficos e clinicopatológicos encontrados refletiram o que a literatura específica sobre assunto tem evidenciado quanto à faixa etária, localização e estadiamento. Além disso, os achados sobre a expressão das proteínas pertencentes a essa via foram mais interessantes em relação à expressão relativa dos genes. Sobre isso, as análises de correlações indicaram que a via de sinalização PI3K-Akt está ativa em CEB. No que diz respeito a relação das proteínas dessa via com fatores clinicopatológicos, pAKT-Ser473 foi significativamente associada com sexo, localização, graduação histológica, AKT total e pAKT1-Thr308 com história familiar de câncer e pGSK3 β -Ser9 com localização. Mais interessante ainda foi a associação entre expressão de GSK3 β e presença de metástase, sugerindo que essa proteína pode ter um papel no desenvolvimento de metástase de CEB.

Em nossa amostra, a proporção masculino/feminino foi de 3:1, com uma média de idade de 60 anos. Esses achados estão de acordo com a literatura, a qual mostra que o CEB afeta mais homens que mulheres, o que parece estar relacionado a maior exposição deles aos fatores de risco ligados ao aparecimento desse tipo de tumor (WARNAKULASURIYA, 2009). De fato, os dados quanto a exposição aos fatores de risco obtidos a partir do questionário semi-estruturado usado nesse estudo para o levantamento dessas informações revelaram que aproximadamente 66,5% dos homens e 11,5% das mulheres faziam ou fizeram uso em algum momento da vida de tabaco e álcool. Quanto a sintomatologia, 83,3% dos pacientes relataram a presença de algum tipo de sintoma, sendo dor o mais frequentemente relatado pelos pacientes (35,3%). Similarmente, a presença de ulceração foi observada em 84,4% dos pacientes. Dor e ulcera são, classicamente, descritos como um dos principais sinais e sintomas comumente observados em pacientes com CEB e, normalmente, estão associados com estágio avançado da doença, fato observado em 67,8% dos pacientes. Esses achados refletem um dado ainda persistente e ominoso quanto à epidemiologia do CEB: muitos pacientes ainda chegam ao primeiro atendimento com tumores ulcerados e acima de 4 cm e com quadro importante de sintomatologia álgica. O tempo de evolução da doença,

caracterizado como tempo transcorrido entre a percepção do paciente sobre a lesão e a busca de atendimento, foi de 6 meses ou mais para a maioria dos pacientes empregados no estudo (56,7%), confirmando o que a literatura sobre tema tem reportado, ou seja, atraso significativo por parte do paciente para procurar atendimento especializado. Existem algumas explicações que podem justificar essa demora, e uma delas está ligada à percepção e/ou desconhecimento dos pacientes quanto à ocorrência de CEB e seus sinais e sintomas iniciais, atrasando o diagnóstico e, por consequência, elevando o tempo de evolução (FARIA et al., 2003). Somado a isso, tem-se o fato de que as lesões nos estágios iniciais são assintomáticas, retardando ainda mais o diagnóstico rápido da lesão quando ela ainda se encontra em estágio inicial. Sobre esse panorama, é pertinente mencionar que o atraso profissional em estabelecer o diagnóstico rápido, seja por inabilidade ou por condições de infraestrutura de atendimento, pode contribuir para esse atraso (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; FARIA et al., 2003; FORD; FARAH, 2013). Como relatado por Hutchison et al. (1994), esse quadro deve ser considerado como inaceitável, principalmente porque existem dois profissionais de saúde (médico e dentista) que podem fazer o diagnóstico de CEB, além do fato de a boca ser um local de fácil acesso e fácil visualização e o CEB ser precedido, na grande maioria dos casos, por lesões pré-malignas.

Quanto a localização, as regiões mais afetadas foram língua (41,1%) e assoalho bucal (27,8%). Como é de conhecimento, o local de acometimento está diretamente relacionado aos fatores de risco e também apresenta uma relação direta com prognóstico, no caso um prognóstico ruim. Além disso, a alta incidência nessas duas regiões anatômicas intrabucais é frequentemente observada nos países ocidentais, ao passo que em países asiáticos ocorre um predomínio de outros sítios intraorais, como mucosa e palato, o que parece estar relacionado com hábito de mastigação de noz areca, betel e tabaco (WARNAKULASURIYA, 2009; TSENG et al., 2011). Sobre tratamento, a modalidade empregada para cada paciente depende de vários fatores, tais como condição clínica, o sítio afetado, tamanho clínico, extensão e invasão tumoral, mas de maneira geral a cirurgia é o tratamento de escolha. No presente estudo, a modalidade trimodal foi o tratamento predominantemente empregado (31,4%), provavelmente porque muitos casos já estavam em estágios avançados da doença (FELLER; LEMMER, 2012; SHAH et al., 2009). Em nosso estudo, nenhum paciente foi tratado exclusivamente por quimioterapia e isso pode ser explicado pela natureza quimioresistente das neoplasias epiteliais de cabeça e pescoço, incluindo o CEB (GOLD et al., 2014).

Os parâmetros estágio e metástase são fatores prognósticos associados com baixa sobrevida (TEICHGRAEBER; CLAIRMONT, 1984; CORTESINA; MARTONE, 2006;

WARNAKULASURIYA, 2009). A análise de sobrevida de cinco anos por Mantel-Cox dos pacientes com a presença de metástase mostrou uma maior quantidade de óbitos comparado ao grupo não metastático, bem como os pacientes em estágio avançado (III e IV) que também apresentaram um maior porcentagem de óbitos em relação aos pacientes em estágio inicial (I e II). Com os demais parâmetros, nenhuma diferença foi encontrada. Esses resultados confirmam a importância desses dois parâmetros na determinação da evolução clínica dos pacientes portadores dessa neoplasia e também reforçam a necessidade de buscar a identificação de marcadores moleculares que possam auxiliar o patologista no diagnóstico precoce e na definição mais precisa do prognóstico do paciente, especialmente na predição de metástases de casos clinicamente negativos.

Com relação ao estudo das proteínas da via de sinalização PI3K-Akt, a média de expressão foi sempre maior no grupo CEB quando comparado com o grupo controle, sendo que para as proteínas GSK3 β e pGSK3 β -Ser9 essas diferenças foram estatisticamente significantes. Esses achados indicam um possível papel delas na patogenia do CEB. Similar a isso, Mishra; Nagini; Rana (2015) mostrou um aumento da expressão de GSK3 β e a sua forma inativa pGSK3 β -Ser9 em CEB quando comparado com o grupo controle. Em um estudo usando modelo de carcinogênese bucal em camundongos através da aplicação tópica de 4NQO, foi mostrado que a proteína pGSK3 β -Ser9 estava significantemente associada com a progressão de displasia para carcinoma (MENDONÇA et al., 2012). Esses achados confirmam o potencial dessas duas proteínas como possíveis biomarcadores de CEB. Não apenas isso, mas os nossos achados vão mais além, na medida em que mostra uma associação significativa entre expressão de GSK3 β e presença de metástase, reforçando ainda mais seu papel como biomarcador de prognóstico. Isso em parte pode ser explicado pelo fato de que, em condições fisiológicas, a GSK3 β ativa promove a degradação de ciclina D1, reduzindo a proliferação celular (TAKAHASHI-YANAGI; SASAGURI, 2008). Um correlação positiva entre a expressão de pGSK3 β -Ser9 e ciclina D1 e p53 tem sido observada em amostras de CEB (MISHRA; NAGINI; RANA, 2015). No caso da amostra investigada, a expressão de GSK3 β e pGSK3 β -Ser9 foi sempre maior no grupo PM, indicando que nesse grupo predominou a expressão da forma inativa da GSK3 β . Nesse sentido, é plausível supor que no grupo PM a ciclina D1 não deve estar sendo inibida, o que pode ter favorecido uma progressão tumoral mais rápida e com aparecimento de clones de células tumorais mais adaptadas a desenvolverem metástases.

A proteína AKT total também estava significativamente mais expressa no grupo CEB, apesar de suas formas fosforiladas não evidenciarem uma diferença estatisticamente

significante entre os grupos. A maioria dos estudos focam na expressão das formas fosforiladas da proteína Akt. No atual estudo, avaliou-se a proteína AKT total, que engloba todas as isoformas independente de fosforilações específicas proteína, e o resultado sugere também um papel na patogenia do CEB. Nos trabalhos de Wu et al. (2008) e Silva et al. (2010), uma maior expressão das formas fosforiladas da proteína Akt em CEB foi encontrada quando comparada com os grupos controle, confirmado o seu envolvimento no desenvolvimento de CEB. Na presente amostra, a forma pAKT-Ser473 mostrou associação estatisticamente significante para os parâmetros gênero, localização e graduação histológica, enquanto que a AKT total e pAKT1-Thr308 com história familiar de câncer. A associação entre fatores clinicopatológicos do CEB e as formas fosforiladas da proteína Akt também já foram descritas por Li et al. (2013) e Lim et al. (2005). Para a proteína pmTOR2448 também houve maior expressão no grupo de CEB comparado ao grupo controle e essa diferença foi estatisticamente significante, corroborando com estudo realizado por Clark et al. (2010) em que houve predomínio da expressão da proteína em casos de CEB quando comparado com epitélio normal, o que reforça o papel dessa proteína no contexto da carcinogênese bucal e, por fim, um papel da via de sinalização PI3K-Akt no desenvolvimento desse tumor.

Em relação a análise comparativa entre os grupos PM, PNM e controle foi possível observar que a maior parte das proteínas analisadas apresentaram maior expressão no grupo PM, com exceção da proteína pAKT1-Thr308, a qual a média de expressão foi igual nos grupos PM e PNM. No entanto, somente a expressão da proteína GSK3 β apresentou diferença significativa entre os grupos controle, PNM e PM, com maior expressão sendo observada no grupo PM. Esse achado reforça um possível papel dessa proteína no desenvolvimento de metástase, como já mencionado acima. Com relação as variáveis clinicopatológicas separadas pelos grupo PM e PNM, a proteína GSK3 β também mostrou associação estatisticamente significante para sexo, histórico de etilismo, histórico de câncer familiar e localização. A proteína GSK3 β tem papel importante na transição epitélio mesênquima (EMT) através da modulação da proteína Snail, fosforilando-a e marcando-a para degradação via proteossomo. A proteína Snail, por sua vez, é um importante repressor transcricional de E-caderina, proteína responsável pela manutenção da adesão das células epiteliais. Portanto, a inibição de GSK3 β pode levar a um acúmulo de Snail e diminuição de E-caderina, contribuindo para o evento EMT (DOBLE; WOODGETT, 2007). Apesar da expressão da forma pGSK3 β -Ser9, a sua forma inativa, também conhecida como forma patológica, ter sido maior no grupo PM, nenhuma diferença foi encontrada entre o grupo PNM e PM. Embora isso possa estar relacionado com tamanho da amostra, a análise subjetiva das lâminas pode ter contribuído

para a ausência de significância. No entanto, os achados permitem afirmar que no grupo PM há uma predominância da forma inativa da GSK3 β quando comparado com o grupo PMN, culminando com o processo de metástase via regulação do evento EMT. Também não se pode descartar a existência de mecanismos regulatórios da proteína GSK3 β que independem de fosforilação para sua inativação via fosforilação do seu resíduo de serina 9, seja pela via de sinalização Wnt/ β -catenina ou pela via PI3K/Akt (DOBLE; WOODGETT, 2003; BALTZIS et al., 2007; LUO, 2009).

A maior parte dos trabalhos que estudaram o papel da via PI3K-Akt em CEB investigaram os componentes (genes e proteínas) da via de forma isolada (KOZAKI et al., 2006; QIU et al., 2006; FENIC et al., 2007; LIM et al., 2005; MASSARELLI et al., 2005; WU et al., 2009; IAMAROON; KRISANAPRAKORKIT, 2009; SILVA et al., 2012; LI et al., 2013; MISHRA; NAGINI; RANA, 2015; GOTO et al., 2002; LIU et al., 2009). O presente estudo abordou, de forma integrada, os principais componentes dessa via de sinalização e seus principais substratos: a pGSK3 β -Ser9 e pmTOR2448. Assim, nós encontramos uma correlação positiva entre AKT total e GSK3 β , assim como entre as formas ativas da AKT, pAKT1-Thr308 e pAKT-Ser473, e seus substratos pGSK3 β -Ser9 e pmTOR2448. Esses resultados evidenciam que a via PI3K-Akt está ativa na amostra estudada e reforçam o seu papel da patogênese e progressão em CEB.

Em relação a expressão gênica, os resultados obtidos foram confrontantes com os achados imuno-histoquímicos para a maioria dos genes investigados. No geral, houve uma maior expressão relativa dos genes no grupo controle do que no grupo CEB, com exceção para os genes *GSK3 β* e *AKT3*, cuja expressões foram maiores neste. No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significante foi encontrada para todos os genes avaliados. No estudo de Qiu et al. (2006), alterações no gene *PIK3CA* foram encontradas tanto em amostras de carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço como também no grupo controle. Pedrero et al. (2004) observou amplificação do gene *AKT2* tanto nas amostras tumorais (carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço) como nos epitélios não tumorais adjacentes ao tumor (grupo controle), sugerindo que essa alteração pode ser um evento precoce no desenvolvimento tumoral. No presente estudo, as amostras controle foram obtidas de mucosas clinicamente normais, o que permite concluir a priori que a expressão relativa dos genes investigados não são decorrentes de amplificações. Uma possível explicação para essa alta expressão nos controles pode ser atribuído pela variação da expressão individual de cada um dos genes nas amostras investigadas, o que de fato se mostrou alta para todos os genes avaliados. As amostras que apresentaram altos coeficientes de variação foram consideradas

como *outliers* e, portanto, foram excluídas da análise, reduzindo muito a quantidade de dados analisados e, por consequência, ocasionando um viés de amostra. Também não se pode descartar que essas variações observadas podem ter advindo de possíveis erros cometidos durante a técnica. Interessante notar que a expressão relativa do gene *mTOR* foi significativamente maior entre o controle e os grupos PM e PNM. Os efeitos mediados pela sinalização mTOR são muito complexos e ainda existem mecanismos não totalmente elucidados. A proteína, juntamente com seus complexos, pode influenciar não somente a progressão no ciclo celular e crescimento, mas também em fenômenos de autofagia, síntese de lipideos e proteínas, metabolismo energético, biogênese de lisossomos, regulação da massa muscular, metabolismo oxidativo, homeostase da glicose, regulação da secreção de insulina, lipogênese entre outros papéis no metabolismo celular normal (LAPLANTE; SABATINI, 2012). Por regular uma grande variedade de processos fisiológicos, a sua desregulação também pode estar relacionada não somente com o câncer mas com uma gama de doenças, tais como diabetes, obesidade, desordens neurodegenerativas, doenças cardiovasculares entre outros que podem fugir do padrão estabelecido como nosso grupo controle.

Por fim, cabe mencionar que a expressão relativa de GSK3 β foi quase três vezes maior no grupo PMN, enquanto que a expressão imuno-histoquímica da proteína foi menor. Considerando que a expressão do RNAm não está diretamente associado a presença da proteína na célula, pois mecanismos traducionais e pós-traducionais podem interferir com a produção da proteína, é provável que isso tenha acontecido na presente amostra. Também não podemos esquecer que nessa análise usamos tumores diferentes daqueles analisados por imuno-histoquímica, e a variação intertumoral, que pode ser explicado pela diversidade de células tumorais presentes dentro do tumor e com perfis gênicos e epigênicos completamente distintos, pode ter contribuido para as diferenças observadas em nível gênico e proteico. Nesse sentido mais estudos são necessários para esclarecer a expressão de genes da via PI3K-Akt. Outro ponto que pode ser levantado é o fato de que as amostras teciduais frescas de conveniência foram obtidas de pacientes mais jovens quando comparado com o grupo experimental, o que pode, em parte explicar, também a variação da expressão gênica.

Em resumo o presente trabalho mostrou evidências de que a via de sinalização PI3K-Akt realmente esteja ativa em CEB, corroborando com trabalhos anteriores que buscaram identificar de maneira isolada a ativação da via. Além disso, reforçou o papel das proteínas da via na carcinogênese oral e possível papel biomarcador, com destaque para a proteína GSK3 β como um possível biomarcador de progressão, especialmente no que diz respeito a predição de metástases para pacientes ainda negativos. Assim, a utilização de drogas que possam levar

a ativação da GSK3 β dentro da célula pode representar uma boa estratégia para o tratamento de pacientes com CEB.

7 CONCLUSÃO

1. Os principais achados sociodemográficos e clinicopatológicos observados foram similares aos já publicados na literatura científica.
2. As proteínas GSK3 β , pGSK3 β -Ser9, AKT total e pmTOR2448 estão relacionadas com o desenvolvimento e progressão do CEB; além disso, a proteína GSK3 β foi considerada um fator preditivo de metástase, discriminando PNM de PM.
3. A análise de correlação mostrou que a via PI3K-Akt está ativa na amostra de CEB estudada.
4. Exceto para os genes *GSK3 β* e *AKT3*, os demais apresentaram uma expressão relativa maior no grupo controle quando comparado com o grupo PNM e PM, sugerindo um papel para esses dois genes no desenvolvimento e progressão de CEB.

REFERÊNCIAS

- AKBULUT, N.; OZTAS, B.; KURSUN, S.; EVIRGEN S. Delayed diagnosis of oral squamous cell carcinoma: a case series. **Journal of Medical Case Reports**, v.5, p. 287-291, 2011.
- ALTOMARE, D. A.; TESTA, J. R. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7455-7464, 2005.
- AMORNPHIMOLTHAM, P.; SRIURANPONG, V.; PATEL, V.; BENAVIDES, F.; CONTI, C. J.; SAUK, J.; SAUSVILLE, E. A.; MOLINOLO, A. A.; GUTKIND, J. S. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 12, p. 4029-4037, 2004.
- ANDRADE, V. P.; CUNHA, I. W.; SILVA, E. M.; AYALA, F.; SATO, Y.; FERREIRA, S. S.; NASCIMENTO, C. F.; SOARES, F. M. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Jornal Brasileiro de Medicina e Patologia Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 55-60, 2007.
- BAGAN, J.; SARRION, G; JIMENEZ Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncology**, v. 46, n. 6, p. 414-417, 2010
- BALTZIS, D.; PLUQUET, O.; PAPADAKIS, A. I.; KAZEMI, S.; QU, L. K.; KOROMILAS, A. E. The eIF2 α kinases PERK and PKR activate glycogen synthase kinase 3 to promote the proteasomal degradation of p53. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 43, p. 31675-31687, 2007.
- BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. Oral cavity and oropharynx. World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer Press, p. 164-208, 2005.
- BIAZEVIC, M. G.; CASTELLANOS, R. A.; ANTUNES, J. L.; MICHEL-CROSATTO, E. Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002. **Caderno Saúde Pública**, v. 22, n. 10, p. 2105-2114, 2006.
- BRUHN, M. A.; PEARSON, R. B.; HANNAN, R. D.; SHEPPARD, K. E. AKT-independent PI3-K signaling in cancer - emerging role for SGK3. **Cancer Management and Research**, v. 5, n. 1, p. 281-292, 2013.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CANTLEY, L. C; NEEL, B. G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. **Proceedings of National Academy Sciences of USA**, v. 96, n. 8, p. 4240-4245, 1999.

CARNERO, A. The PKB/AKT pathway in cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 116, n. 1, p. 34-44, 2010.

CLARK, C.; SHAH, S.; FERDINANDEZ, L. H.; EKSHYYAN, O.; ABREO, F.; RONG, X.; McLARTY, J.; LOURIE, A.; MILLIGAN, E. J.; NATHAN C. A. O. Teasing out the best molecular marker in the AKT/MTOR pathway in HNSCC patients. **Laryngoscope**, v. 120, n. 6, p. 1159-1165, 2010.

CLEVERS, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 469-480, 2006.

COHEN, Y.; GOLDENBERG-COHEN, N.; SHALMON, B.; SHANI, T.; OREN, S.; AMARIGLIO, N.; DRATVIMAN-STOROBINSKY, A.; YAHALOM, R.; KAPLAN, I.; HIRSHBERG, A. Mutational analysis of PTEN/PIK3CA/ AKT pathway in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 47, n. 10, p. 946-950, 2011.

COOPER, J. S.; PORTER, K.; MALLIN, K.; HOFFMAN, H. T.; WEBER, R. S.; ANG, K. K.; GAY, E. G.; LANGER, C. J. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. **Head Neck**, v.31, n. 6, p. 748–758, 2009.

CORTESINA, G.; MARTONE, T. Molecular metastases markers in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v. 26, n. 6, p. 317-325, 2006

DETRE, S.; SCLANI, J. G.; DOWSETT, M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 48, n. 9, p. 876-878, 1995.

DOBASHI, Y.; WATANABE, Y.; MIWA, C.; SUZUKI, S.; KOYAMA, S. Mammalian target of ramamycin: a central node of complex signaling cascades. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 4, n. 5, p. 476-495, 2011.

DOBLE, B. W.; WOODGETT. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 7, p. 1175-1186, 2003.

DOBLE, B. W.; WOODGETT, J.R. Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial-mesenchymal transitions. **Cells Tissues Organs**, v. 185, n. 3, p. 73-84, 2007.

DOBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 24, n. 1, p. 9-17, 2005.

DU, L.; SHEN, J.; WEENS, A.; LU, S. L. Role of phosphatidylinositol-3-kinase pathway in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Oncology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

EKIM, B.; MAGNUSON, B.; JAQUEZ, H. A. A.; KELLER, J. A.; FEENER, E. P.; FINGAR, D. C. mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 14, p. 2787-2801, 2011.

ENGELMAN, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 8, p. 550-562, 2009.

FARAGO, M.; DOMINGUEZ, I.; LANDESMAN-BOLLANG, E.; XU, X.; ROSNER, A.; CARDIFF, R. D.; SELDIN, D. C. Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3 β promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 65, n. 13, p. 5792-5801, 2005.

FARIA, P. R.; CARDOSO, S. V.; NISHIOKA, S. A.; SILVA, S. J.; LOYOLA, A. M. Clinical presentation of patients with oral squamous cell carcinoma when first seen by dentists or physicians in a teaching hospital in Brazil. **Clin Oral Invest**, v. 7, p. 46-51, 2003.

FELLER, L.; LEMMER, J. Oral squamous cell carcinoma: epidemiology, clinical presentation and treatment. **Journal of Cancer Therapy**, v. 3, n. 4, p. 263-268, 2012.

FENIC, I.; STEGER, K.; GRUBER, C.; ARENS, C.; WOENCKHAUS, J. Analysis of PIK3CA and Akt/protein kinase B in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**, v. 18, n. 1, p. 253-259, 2007.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.

FOSTER, K. G.; FINGAR, D. C. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14071-14077, 2010.

FORD, P. J.; FARAH, C. S. Early detection and diagnosis of oral cancer: Strategies for improvement. **Journal of Cancer Policy**, v. 1, n. 1-2, p. 2-7, 2013.

FORTIER, A. M.; VAN THEMSCHE, C.; ASSELIN, E.; CADRIN, M. Akt isoforms regulate intermediate filament protein levels in epithelial carcinoma cells. **FEBS Letters**, v. 584, n. 5, p. 984-988, 2010.

GENDEN, E. M.; FERLITO, A.; SILVER, C. E et al. Contemporary management of the oral cavity. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 267, n. 7, p. 1001-1017, 2010.

GILTNANE, J.M; RIMM, D. L. Technology insight: identification of biomarkers with tissue microarray technology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 1, n. 2, p. 104-111, 2004.

GIUDICE, F. S.; SQUARIZE, C. H. The determinants of head and neck cancer: unmasking the PI3K pathway mutations. **Journal Carcinogenesis & Mutagenesis**, v. 85, n. 1, p. 1-15, 2013.

GOLD, K. A.; NESKEY, M.; WILLIAM, W. N. JR. The role of systemic treatment before, during, and after definitive treatment. **Otolaryngologic Clinics North America**, v. 46, n. 4, p. 645-656, 2013.

GONZALEZ, E.; McGRAW, T. E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. **Cell Cycle**, v. 8, n. 16, p. 2502-2508, 2009.

GOTO, H.; KAWANO, K.; KOBAYASHI, I.; SAKAI, H.; YANAGISAWA, S. Expression of cyclin D1 and GSK3 β and their predictive value of prognosis in squamous cell carcinomas of the tongue. **Oral Oncology**, v. 38, n. 6, p. 549-556, 2002.

HOLMES, J. D. Neck Dissection: Nomenclature, Classification, and Technique. **Oral Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 459-475, 2008.

HUTCHISON, I. L. Improving the poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. **British Medical Journal**, v.308, p.669–670, 1994.

IAMAROON, A.; KRISANAPRAKORNKIT, S. Overexpression and activation of Akt2 protein in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 10, n. 1, p. 175-179, 2009.

INCA. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro; 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>.

JAQUEZ, H. A. A.; KELLER, J. A.; FOSTER, K. G.; EKIM, B.; SOLIMAN, G. A.; FEENER, E. P. F.; BALLIF, B. A.; FINGAR, D. C. Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. **Molecular and Celular Biology**, v. 29, n. 15, p. 4308-4324, 2009.

JOHNSON, N.; FRANCESCHI, S.; FERLAY, J.; RAMADAS, K.; SCHIMID, S.; MACDONALD, D, et al. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidrakys D, editor. Pathology e Genetics, WHO Classification Head and Neck Tumours. IARCPRes, Lyon, v. 430, p. 163-175, 2005.

JOPE, R. S.; YUSKAITIS, C. J.; BEUREL, E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 4-5, p. 577-595, 2007.

KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of world. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 14, p. 2137-2150, 2006.

KLEIN C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. **Nature Reviews**, v. 9, n. 4, p. 302-312, 2009.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O. P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, v. 4, n. 7, p. 844-847, 1998.

KOZAKI, K. I.; IMOTO, I.; PIMKHAOKHAM, A.; HASEGAWA, S.; TSUDA, H.; OMURA, K.; INAZAWA, J. PIK3CA mutation is an oncogenic aberration at advanced stages of oral squamous cell carcinoma. **Cancer Science**, v. 97, n. 12, p. 1351-1358, 2006

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274-293, 2012.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2011.

LEEMANS, C. R.; TIWARI, R.; NAUTA, J. J. P.; WALL, I. V. D.; SNOW, G. B. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. **Cancer**, v. 73, n. 1, p. 187- 190, 1994.

LI, J. C.; ZHU, H. Y.; CHEN, T. X.; ZOU, L. Y.; WANG, X. Y.; ZHAO, H. C.; XU, J. Roles of mTOR and p-mTOR in gastrointestinal stromal tumors. **Asian Pacific Organization for Cancer Prevention**, v. 14, n. 10, p. 5925-5928, 2013.

LI, Y.; WANG, J.; WANG, F.; WANG, H.; WANG, J.; ZENG, X.; LIAO, G.; DAN, H.; CHEN, Q. Tissue microarray analysis reveals the expression and prognostic significance of phosphorylated AktThr³⁰⁸ in oral squamous cell carcinoma. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology**, v. 116, n. 5, p. 591-597, 2013.

LIM, J.; KIM, J. H.; PAENG, J. Y., KIM, M. J.; HONG, S. D.; LEE, J. I.; HONG, S. P. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, n. 11, p. 1199-1205, 2005.

LIU, F. Y.; ZHAO, Z. J.; LI, P.; DING, X.; ZONG, Z. H.; SUN, C. F. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the survival of cells mediated by chemokine receptor 7 through PI3K/Akt in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **British Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 48, n. 4, p. 291-296, 2010.

LIU, P.; CHENG, H.; ROBERTS, T. M.; ZHAO, J. J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 8, p. 627-644, 2009.

LUO, J. Glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. **Cancer Letters**, v. 273, n. 2, p. 194-200, 2009.

LUSTIG, B.; BEHRENS, J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 129, n. 4, p. 199-221, 2003.

MARTELLI, A. M.; TABELLINI, G.; BRESSANI, D.; OGNIBENE, A.; GOTO, K.; COCCO, L.; EVANGELISTI, C. The emerging multiple roles of nuclear Akt. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, n. 12, p. 2168-2178, 2012.

MENDONÇA, D.F.; CHAMMAS, R.; LIU, F.T.; NONOGAKI, S.; CARDOSO, S.V.; LOYOLA, A.M.; DE FARIA, P.R. The inactive form of glycogen synthase kinase-3β is associated with the development of carcinomas in galectin-3 wild-type mice, but not in galectin-3-deficient mice. **International Journal Clinical Experimental Pathology**, v. 5, n. 6, p. 547-554, 2012.

MISHRA, R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. **Molecular Cancer**, v. 9, p. 144, 2010.

MISHRA, R.; NAGINI, S.; RANA, A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1-20, 2015.

MORAL, M.; PARAMIO, J. M. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. **Histology Histopathology**, v. 23, n. 10, p. 1269-1278, 2008.

NAVÉ, B. T.; OUWENS, M.; WITHERS, D. J.; ALESSI, D. R.; SHEPHERD, P. R. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. **Biochemical Journal**, v. 344, p. 427-431, 1999.

NICHOLSON, K. M.; ANDERSON, N. G. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. **Cellular Signalling**, v. 14, n. 5, p. 381-395, 2002.

NOGUTI, J.; MOURA, C. F. G.; JESUS, G. P. P.; SILVA, V. H. P.; HOSSAKA, T. A.; OSHIMA, C. T. F.; RIBEIRO, D. A. Metastasis from oral cancer: an overview. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 9, n. 5, p. 329-336, 2012.

OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 40, n. 3, p. 298-307, 2011.

OSAKI, M.; OSHIMURA, M.; ITO, H. PI3K-AKT pathway: its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 667-676, 2004.

PEDRERO, J. M. G.; CARRACEDO, D. G.; PINTO, C. M.; ZAPATERO, A. H.; RODRIGO, J. P.; NIETO, C. S.; GONZALES, M. V. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 114, n. 2, p. 242-248, 2005.

PITIYAGE, G.; TILAKARATNE, W. M.; TAVASSOLI, M.; WARNAKULASURIYA, S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 38, n. 10, p. 737-752, 2009.

PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. **Frontiers Oncology**, v. 4, p. 64-75, 2014.

QIU, W.; SCHONLEBEN, F.; LI, X.; HO, D. J.; CLOSE, L. G.; MANOLIDIS, S. BENNETT, B. P.; SU, G. H. *PIK3CA* mutations in head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. 1441-1446, 2006.

SAJI, M.; RINGEL, M. D. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 321, n. 1, p. 20-28, 2010.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1102, 2008.

SHAH, J. P.; GIL, Z. Current concepts in management of oral cancer-surgery. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 394-401, 2009.

SHIOJIMA, I.; WALSH, K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. **Circulation Research**, v. 90, n. 12, p. 1243-1250, 2002.

SILVA, B. S. F.; YAMAMOTO, F. P.; PONTES, F. S.; CURY, S. E. V. C.; FONSECA, F. P.; PONTES, H. A. R.; JÚNIOR, D. S. P. Twist and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 17, n. 1, p. 29-34, 2012.

SIMARD, E. P.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. **Oral Oncology**, v. 50, n. 5, p. 387-403, 2014.

SOBIN, L. H.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. TNM Classification of Malignant Tumours. International Union Against Cancer (UICC). 7th ed. Oxford, UK, Wiley-Blackwell, 2009.

TAKAHASHI-YANAGI, F.; SASAGURI, T. GSK-3 β regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 4, p. 581-589, 2008.

TEICHGRAEBER, J. F., CLAIRMONT, A. A. The incidence of occult metastases for cancer of the oral tongue and floor of the mouth: treatment rationale. **Head Neck Surgery**, v. 7, n. 1, p. 15-21, 1984.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) Primer design using free online software. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145-154, 2011.

TOKUNAGA, E.; OKI, E.; EGASHIRA, A.; SADANAGA, N.; MORITA, M.; KAKEJI, Y.; MAEHARA, Y. Deregulation of the Akt pathway in human cancer. **Current Cancer Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 27-36, 2008.

TSENG, Y. H.; YANG, C. C.; LIN, S. C.; CHENG, C. C.; LIN, S. H.; LIU, C. J.; CHANG, K. W. Areca nut extract upregulates vimentin by activating PI3K/AKT signaling in oral carcinoma. **Oral Pathology & Medicine**. v. 40, n. 1, p. 160-166, 2011.

TSUCHIYA, A.; KANNO, T.; NISHIZAKI, T. PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 1, p. 49-59, 2013.

VADLAKONDA, L.; DASH, A.; PASUPULETI, M.; KUMAR, K. A.; REDDANA, P. The paradox of Akt-mTOR interactions. **Frontiers in Oncology**, v. 3, p. 165-174, 2013.

VANHAESEBROECK, B.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 195-203, 2012.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489-501, 2002.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 309-316, 2009.

WILLEMS, L.; TAMBURINI, J.; CHAPUIS, N.; LACOMBE, C.; MAYEUX, P.; BOUSCARY, D. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. **Current Oncology Reports**, v. 14, n. 2, p. 129-138, 2012.

WONG, K. K.; ENGELMAN, J. A.; CANTLEY, L. C. Targeting the PI3K signaling in cancer. **Current Opinion Genetics and Development**, v. 20, n. 1, p. 87-90, 2009.

WOOLGAR, J. A.; ROGERS, S. N.; LOWE, D.; BROWN, J. S.; VAUGHAN, E. D. Cervical lymph node metastasis in oral cancer: the importance of even microscopic extracapsular spread. **Oral Oncology**, v. 39, n. 2, p. 130-137, 2003.

WU, H. T.; KO, S. Y.; FONG, J. H. J.; CHANG, K. W.; LIU, T. Y.; KAO, S. Y. Expression of phosphorylated Akt in oral carcinogenesis and its induction by nicotine and alkaline stimulation. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 2, p. 206-213, 2009.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Uberlândia/MG

PROJETO DE PESQUISA

Título: ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/BETA-CATENINA EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CAVIDADE BUCAL E SUA RELAÇÃO COM FATORES DE PROGNÓSTICO

Pesquisador: Paulo Rogério de Faria

Versão: 1

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia/ FUFU/ MG **CAAE:** 00593312.1.0000.5152

PARECER DO COLEGIADO

Número do Parecer: 5715

Data da Relatoria: 03/02/2012

Apresentação do Projeto:

O câncer bucal constitui-se em um importante problema que aflige não somente o Brasil. Aqui, o câncer bucal está situado entre as 10 mais frequentes neoplasias e as 20 maiores causas de morte na população. Apresenta prognóstico ruim, pois a maioria é diagnosticada nos estágios III e IV. É nesse contexto que o câncer de boca pode ser considerado como um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo e esforços têm que ser tomados para descobrir os mecanismos que norteiam o seu desenvolvimento bem como a sua progressão. Nesse sentido, a via de sinalização Wnt e seus produtos gênicos (proteína APC, beta-catenina, c-myc, ciclina D1 e GSK3beta) aparecem como fortes candidatos no sentido de compreender os mecanismos moleculares que culminam com a transformação maligna e progressão tumoral, em especial o câncer de boca. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é identificar a expressão de produtos gênicos relacionadas à via canônica da ativação do gene Wnt (GSK β , β -catenina, ciclina D1, c-myc, APC) em carcinomas epidermóides bucais e verificar sua associação com o comportamento biológico tumoral e o prognóstico dos pacientes acometidos. O estudo será realizado a partir de uma amostra inicial de 243 carcinomas Epidermóides Bucais (CEB) diagnosticados e/ou tratados no Complexo Hospitalar da Universidade Federal de Uberlândia (Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina, Hospital Odontológico e Hospital do Câncer) entre 2006 e 2013 (amostra retrospectiva e prospectiva). Serão incluídos no estudo todos os casos com diagnóstico de CEB (ou sinônimos: carcinoma epidermóide, carcinoma espinocelular) acometendo os tecidos bucais, lábio e orofaringe, correspondendo aos seguintes códigos CID: C00 a C006 e C09 e C10. Para os casos já coletados e para os novos casos (a partir de 2012 até 2013), a coleta dos dados foi e será baseado na utilização de m instrumento de coleta qualificado como um questionário semiestruturado onde constam os itens a serem coletados, a saber: dados relativos às características demográficas e sócio-econômico-culturais dos pacientes como: idade, sexo, cor; sobre comportamentos relacionados à doença: uso de produtos de fumo e álcool; e sobre as características clínico-patológicas da doença: tempo de evolução, localização, dimensão e estadiamento baseado nos critérios do Sistema de Estadiamento da International Union Against Cancer. Também serão coletados, em formulário próprio, dados decorrentes da análise histopatológica dos casos incluídos no estudo, tais como, grau de diferenciação tumoral, profundidade de invasão tumoral, invasão angiolinfática e invasão neural e/ou perineural. Para detecção das proteínas relacionadas à via de sinalização Wnt será realizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. A avaliação da imuno-histoquímica para cada proteína será feita pela técnica do Quickscore, que relaciona intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas. Os dados serão descritos por meio de estatística descritiva considerando, quando pertinente, o emprego de médias e /ou medianas, e freqüências relativas (percentuais). Serão empregados os testes do Qui Quadrado de Pearson para análise de regressão logística univariada para avaliação das diferentes variáveis estudadas quanto a sua associação com metástases linfonodais, considerando os diferentes抗ígenos pesquisados, acompanhada de medidas de associação (odds ratio), considerando, a priori, valor de p 0,20. Posteriormente, os dados selecionados quanto a significância serão testados em modelo de regressão logística, para valores de p 0,05. A análise de sobrevida considerará a construção de curvas de sobrevida (Kaplan-Meyer) e analisadas por meio do teste de Log-Rank considerando valores de p0,05 para rejeitar a hipótese de nulidade. Cada antígeno pesquisado será considerado individualmente na análise. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism, versão 4,01 (Graphpad Inc, USA, 2005).

Objetivo da Pesquisa:

Identificar a expressão de produtos gênicos relacionadas à via canônica da ativação do gene Wnt (GSK β , β -catenina, ciclina D1, c-myc, APC) em carcinomas epidermóides bucais e verificar sua associação com o comportamento biológico tumoral e o prognóstico dos pacientes acometidos.

Objetivos específicos: 1.Identificar e quantificar a expressão dos抗ígenos (GSK β , β -catenina, ciclina

D1, c-myc, APC) nos casos de carcinomas epidermóides atendidos e tratados no complexo hospitalar da Universidade Federal de Uberlândia. 2.Analizar a presença de associação entre a expressão dos diferentes produtos gênicos mencionados no item 1 com fatores clínico-patológicos dos casos incluídos no estudo. 3.Analisar, comparativamente, a expressão dos produtos gênicos da ativação do gene Wnt já mencionados (item 1) nos casos de carcinomas epidermóides bucais primários com comportamentos biológicos distintos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente projeto tem por objetivo investigar a existência de associação dos fatores sócio-demográficos e clínico patológicos de uma amostra de pacientes com câncer bucal (carcinomas epidermóides de boca) com a expressão dos抗genos GSK3 β , β -catenina, ciclina D1, c-myc, e APC, visando identificar o poder discriminador da expressão destes抗genos de tumores com comportamentos biológicos distintos e prognóstico. Para tanto, utilizaremos uma planilha de banco de dados que está em construção, da qual constam dados cuja natureza foi mencionada anteriormente, dos pacientes com câncer bucal atendidos e tratados no Hospital de Clínicas e Hospital de Câncer em Uberlândia e dados provenientes de análises histológicas que se basearam na avaliação de fragmentos de tumor provenientes de cirurgias realizadas para seu tratamento. Estes fragmentos serão tratados em ambiente de laboratório, sem nenhum envolvimento dos pacientes nestes procedimentos. Assim, todos os dados serão coletados mediante a utilização de um questionário próprio, já empregado anteriormente em outra pesquisa aprovada neste Comitê, referente ao trabalho da CD Cizelene Veloso Faleiros Guedes, intitulado: *“Avaliação do atraso no diagnóstico e tratamento de carcinoma espinocelular em cabeça e pescoço”* e de Iniciação Científica das alunas Natália Vieira Gonçalves, sub projeto do projeto supracitado, e de Natália Pereira Alves referente ao projeto *“Carcinoma epidermóide bucal: estudo dos fatores associados ao diagnóstico de doença avançada”*, com registros CEP aprovados sob os números 250/08; 202/09 e 264/11, respectivamente. Todos os dados serão coletados posteriormente a adesão espontânea do paciente a pesquisa e sua assinatura no termo de consentimento livre e esclarecido sobre o conteúdo do trabalho. Nesta planilha, os pacientes são identificados segundo o número de seus prontuários, codificados de forma a não permitir ao leitor sua identificação e a procedência dos dados. Todos os dados coletados estão relacionados ao próprio paciente e a sua doença, sem que seja necessária a sua manipulação ou mesmo a intervenção direta do profissional no paciente, de qualquer tipo para diagnóstico ou tratamento das lesões. Isto será realizado na oportunidade do seu exame clínico ou mesmo da biópsia indicada pelos profissionais nas diferentes clínicas nas quais será atendido, não necessitando, portanto, sua presença no ambiente hospitalar somente para a coleta dos dados. Desta forma, o único risco presente na pesquisa em relação ao paciente é a sua possível identificação na pesquisa, no entanto haverá todos os esforços possíveis e o devido comprometimento da equipe executora com o sigilo absoluto da identidade do sujeito.

Benefícios: Os benefícios para o paciente estão relacionados ao próprio objetivo do projeto, já que visa identificar os fatores preditivos e associados ao processo de metástases, baseados na expressão dos抗genos supracitados. Isto constituirá informação relevante na formulação de intervenções que visem a minimizar o padrão de diagnóstico inadequado ao tratamento e prognóstico da doença para os pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com relevância científica e social. Apresenta ampla revisão sobre o estado da arte dos processos relacionados ao tema em estudo.

Não apresenta comprometimento ético

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Recomendações:

Aprovar o projeto com as avaliações subsequentes dos relatórios a serem apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVAÇÃO do projeto de pesquisa

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

, 24 de Fevereiro de 2012

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada “*Estudo da expressão de proteínas via de sinalização wnt/beta-catenina em amostras de carcinomas epidermóides de cavidade bucal e sua relação com fatores de prognóstico*”, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria.

Nesta pesquisa nós estamos buscando identificar e entender fatores relacionados ao comportamento do tumor (carcinoma epidermóide bucal, carcinoma de células escamosas bucais) e fatores que possam explicá-los visando melhorar a detecção de metástases e o tratamento da doença. Desta forma, nos comprometemos a coletar os dados apenas no momento do atendimento do paciente na sua consulta previamente agendada e na utilização dos materiais biológicos provenientes da biopsia e do seu tratamento.

Na sua participação você será submetido à aplicação de um questionário semi-estruturado, contendo perguntas sobre os dados de sexo, idade, cor, comportamentos relacionados à doença, e características clínicas da doença. Esclarecemos que estes dados serão anotados em formulário específico que, após o seu uso, serão totalmente destruídos.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Desta maneira, o único risco presente nesta pesquisa é a sua possível identificação, no entanto haverá todos os esforços possíveis e o devido comprometimento da equipe executora com o sigilo absoluto da sua identidade.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Não haverá, portanto, nenhum risco orgânico ou de natureza psicológica para você. Os benefícios serão aqueles decorrentes da própria investigação, ou seja, identificar fatores relacionados ao diagnóstico de metástases e na repercussão do tratamento que poderá ser importante na resposta ao tratamento da doença.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Paulo Rogério de Faria e Flávia Sayuri Matsuo, Sala 2B256 (Laboratório de Histologia –

ICBIM/UFU), Umuarama – Uberlândia (MG), telefone: (34) 3218-2240, Ramal 23. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131

Uberlândia, de .

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

ANEXO C - Questionário de Entrevista

Prontuários: HC:_____ Onco:_____ Odonto:_____

Questionário de entrevista

A precisão dos dados anotados nesse formulário é fundamental para a aceitação científica desse trabalho

Dados demográficos

Idade: _____ anos

Sexo: Masculino Feminino

Cor ou raça informada: Branca Preta Parda Amarela Indígena

Dados sócio-econômico-culturais

Profissão nos últimos dez anos: _____

Em atividade: Sim

Não: Aposentado

Inválido

Desempregado

Escolaridade: Analfabeto

Primário incompleto

Primário completo

Secundário incompleto

Secundário completo

Superior incompleto

Superior completo

Renda em salários mínimos: _____

Hábitos alimentares

Freqüência em dias em que ingere:

- Arroz e feijão: _____ dias / semana

- Carne: _____ dias / semana

- Vegetais: _____ dias / semana

Consumo de agentes carcinogênicos para a mucosa bucal

Quanto ao consumo de fumo, você:

Nunca fumou

É ex-fumante

É fumante ativo

Qual produto você consome / consumia predominantemente:

Cigarro industrial com filtro

Cigarro de palha / rolo

Cachimbo

Fumo de mascar

Qual é a quantidade consumida por dia: _____

Idade em que iniciou o uso: _____ anos

Usa ou já usou outro tipo de fumo?

Não

Sim

Ex-fumante: há quanto tempo abandonou o hábito? _____

Tem filhos? Não Sim: Algun deles consome cigarro? Não Sim

Você consome algum tipo de bebida alcoólica? Não Sim

Prontuários: HC: _____ Onco: _____ Odonto: _____

Qual o tipo de produto ingerido com maior freqüência?: Fermentado / cerveja
 Destilado / cachaça / whisky

Qual a freqüência mais comum de ingestão? Diária
 Semanal
 Mensal
 Ocasional

Qual a quantidade consumida em cada ocasião?: _____

Qual a idade em que você iniciou o uso: _____

Higiene e saúde geral e bucal

Sua residência possui: Água encanada? Rede de esgoto?
 Asfalto na rua? Rede de energia?

Você teve acesso a alguma dessas benfeitorias há menos de cinco anos? Não Sim

Como você geralmente obtém acesso a dentista? Serviço público / posto de saúde / UAI
 Serviço público / faculdade
 Atendimento particular / convênio

Como você geralmente obtém acesso a médico? Serviço público / posto de saúde / UAI
 Serviço público / faculdade
 Atendimento particular / convênio

Sua última consulta com dentista (fora da UFU) foi relacionada à lesão? Não Sim

Há quanto tempo foi realizada a última consulta com dentista, exceto para examinar a lesão? _____

De quem foi a orientação para procurar tratamento para a doença?
 Próprio paciente Familiares Farmacêutico Dentista Médico

O que você acha que foi a causa da doença? _____

Alguém da sua família já teve câncer: de boca? de garganta? de pulmão?)

Dados sobre a lesão

É dolorosa? Não Sim
Apresenta sangramento? Não Sim

Há quanto tempo foi notada? _____ meses

Quem primeiro viu a lesão?
 Próprio paciente Familiares Farmacêutico Dentista Médico