

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Aspectos genéticos e bioquímicos de PTEN em cânceres hepáticos primários

Giuliana Finotti Pires

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Ituiutaba - MG

Dezembro - 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Aspectos genéticos e bioquímicos de PTEN em cânceres hepáticos primários

Giuliana Finotti Pires

Luciana Karen Calábria

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Ituiutaba - MG

Dezembro - 2020

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo esforço investido na minha educação para que o sonho de entrar em uma Universidade se tornasse possível, além de todo incentivo e confiança depositado em mim durante a graduação.

À minha psicanalista Telma Abrahão por me fazer acreditar que eu seria capaz de produzir um ótimo trabalho e superar todos os obstáculos que a vida me apresentasse, me tornando uma pessoa melhor e mais confiante.

Aos meus amigos que tornaram essa caminhada mais leve, criando diversos momentos de distração e agregando muitas memórias boas com risadas, fofocas, ensinamentos, broncas e conselhos que vou levar pra toda vida.

À minha professora e orientadora Dra. Luciana Karen Calábria que tanto admiro desde o primeiro contato em sala, pelo apoio, dedicação e motivação durante todo processo de realização deste trabalho, principalmente por me aceitar como sua orientanda. Agradeço pela oportunidade, respeito, carinho e forma que desempenhou tal função com amizade e cuidado. Obrigada por estar sempre presente indicando a direção correta que o trabalho deveria tomar. Sem você nada disso seria possível.

Por último, mas não menos importante, agradeço à Universidade Federal de Uberlândia – *campus* Pontal e todo o seu corpo docente e técnicos.

RESUMO

O carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma intra-hepático são os dois principais tipos de câncer hepático primário, sendo que o segundo é originário no epitélio dos ductos biliares intra ou extra-hepáticos. Vista a importância médica e epidemiológica desses cânceres, bem como dos seus marcadores, este estudo teve como objetivo investigar a estrutura e função do gene e da proteína *phosphatase and tensin homologue* (PTEN) no organismo humano e sua relevância nos estudos relacionados ao câncer hepático. Por meio de ferramentas de bioinformática e revisão da literatura constatou-se que o gene *PTEN* está localizado na região 10q23.31 e atua na supressão tumoral e motilidade celular. Já a proteína pertencente à família tirosina fosfatase, podendo estar localizada no núcleo, no citoplasma e na região extracelular, sendo constituída de pelo menos cinco domínios estruturais. O gene *PTEN* pode ser expresso em diversos tecidos humanos, incluindo o fígado, onde está associado ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular e sua influência na via PI3K/AKT, além de mutações do tipo *missense*, as quais alteram principalmente a funcionalidade da proteína. No colangiocarcinoma e no carcinoma hepatocelular, o miRNA21 revelou ser um potencial biomarcador. Entender as inúmeras possibilidades de regulação da atividade de PTEN ainda é um tema pertinente para estudo, uma vez que por meio desse mecanismo podemos entender como modular a sua atividade em prol terapêutico, de diagnóstico e prognóstico eficientes do câncer.

Palavras-chave: carcinoma; bioinformática; fígado; biomarcador

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| AKT | Família de proteínas quinases |
| BAD | Antagonista da morte celular de Bcl2 |
| BCL-XL | Proteína reguladora de apoptose |
| BMF | Fator modificador do Bcl-2 |
| Ca ²⁺ | Cálcio |
| CASP3 | Membro da família das proteases de cisteína-aspartato |
| CAT1 | Transportador de aminoácidos catiônicos 1 |
| Cdc37 | Ciclo de divisão celular 37 |
| c-MET | Proto-oncogene codificador da proteína receptora do fator de crescimento de hepatócito |
| COSMIC | <i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i> |
| CTMP | Proteína moduladora carboxi-terminal |
| Cyclin G1 | Ciclina-G1 |
| DBGET | <i>Integrated Database Retrieval System</i> |
| DDIT4 | Dano ao DNA induzido pela proteína transcrita 4 |
| DG | Diglicerídeo |
| Dlg | <i>Discs large</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNMT1 | DNA metiltransferase 1 |
| EGFR | Receptor do fator de crescimento epidérmico |
| ELK1 | Fator de transcrição ETS |

| | |
|---------|--|
| ERK | Proteína quinase regulada por sinal extracelular |
| Gβγ | Complexo G beta-gama |
| G > T | Guanina > Tirosina |
| GPCR | Receptor acoplado à proteína G |
| Grb2 | Proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento |
| HCV RNA | Teste para identificação de material genético do vírus da hepatite C |
| HMGA2 | Grupo de alta mobilidade AT-hook 2 |
| HO-1 | Enzima heme oxigenase 1 |
| HOXD10 | <i>Homeobox protein Hox-D10</i> |
| HSP90 | Proteína de choque térmico 90 |
| IGF1R | Receptor do fator de crescimento insulina-I |
| IGF-II | Fator de crescimento de insulina-II |
| IP3 | Inositol-1,4,5-trifosfato |
| kDA | Quilodalton |
| KEGG | <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> |
| MAG1 | Guanilato-quinase associada à membrana |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| MEK | Quinase ativadora das proteínas quinases ativadas por mitógeno |
| miRNA | Micro RNA |
| MMAC1 | <i>Phosphatase mutated in multiple advanced cancers</i> |
| MMP9 | Metalopeptidase 9 da matriz |
| mTOR | Alvo de mamíferos da rapamicina |

| | |
|---------------|---|
| MYC | Família de genes reguladores e proto-oncogenes que codificam fatores de transcrição |
| NCBI | <i>National Center of Biotechnology Information</i> |
| NX | Expressão normalizada |
| PAK4 | Proteína quinase do grupo 4 ativada por p21 |
| PBD | Domínio fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato |
| PDB | <i>Protein DataBase</i> |
| PDK1 | Piruvato desidrogenase quinase 1 |
| PDZ | Domínio de ligação de proteína (PSD-95/Dlg/ZO-1) |
| PEST | Domínio rico em prolina, glutamina, serina e treonina |
| PHLPP | Domínio PH e proteína fosfatase de repetição rica em leucina |
| PI3K | Fosfoinosítideo-3-quinase |
| PIP2 | Fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato |
| PIP3 | Fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato |
| PKB | Proteína quinase B |
| PKC | Proteína quinase C |
| PLC- γ | Fosfolipase C gama |
| PP2A | Proteína fosfatase 2A |
| PSD-95 | <i>postsynaptic density protein 95</i> |
| PSORT | <i>Protein subcellular localization prediction</i> |
| PTEN | <i>Phosphatase and tensin homologue</i> ; fosfatase homóloga à tensina |
| PTP | Proteína tirosina-fosfatase |
| RAF | Quinase específica para Ser/Thr |

| | |
|------------------|--|
| RAS | GTPase HRas |
| RASSF1A | Domínio de associação Ras contendo a proteína 1A |
| RNA _m | RNA mensageiro |
| RNA-Seq | Técnica de sequenciamento de RNA |
| RNA _t | RNA transportador |
| RPKM | <i>Reads per kilobase por milion mapped reads</i> |
| S6K | Proteína ribossômica S6 quinase beta |
| SHC | <i>Src homology 2 domain containing-transforming protein 2</i> |
| SOS | Fator de troca do nucleotídeo guanina |
| STAT3 | Sinalização para tradução e ativação da transcrição 3 |
| STMN1 | Estatimina 1 |
| TCL1 | Célula T de leucemia/linfoma 1 |
| TGF α | Fator de crescimento transformante alfa |
| ZO-1 | <i>Zona occludens 1</i> |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Localização cromossômica do gene <i>PTEN</i> | 20 |
| Figura 2 | Características das sequências da PTEN | 24 |
| Figura 3 | Sequência de alinhamento das estruturas da PTEN e sítio ativo | 26 |
| Figura 4 | Estrutura dos domínios da PTEN | 26 |
| Figura 5 | Análise transcriptômica do gene <i>PTEN</i> de <i>Homo sapiens</i> | 28 |
| Figura 6 | Expressão do gene <i>PTEN</i> de <i>Homo sapiens</i> | 30 |
| Figura 7 | Vias de sinalização do carcinoma hepatocelular | 32 |
| Figura 8 | Via de sinalização PI3K/AKT | 33 |
| Figura 9 | Localização e intensidade da frequência das mutações <i>missense</i> | 35 |
| Figura 10 | Via de sinalização de miRNAs no carcinoma hepatocelular | 37 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Características do gene <i>PTEN</i> | 19 |
| Tabela 2 | Informações bioquímicas da proteína PTEN | 21 |
| Tabela 3 | Composição de aminoácidos da sequência primária de PTEN | 22 |

SUMÁRIO

| | |
|------------------------|----|
| INTRODUÇÃO | 12 |
| OBJETIVOS | 16 |
| METODOLOGIA | 17 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 19 |
| CONCLUSÃO | 38 |
| REFERÊNCIAS | 39 |

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde ([WHO], 2020a), câncer é o nome dado ao conjunto de um grande grupo de doenças que têm em comum o crescimento incontrolável de células anormais. Em alguns casos pode se limitar a invadir apenas partes próximas ou espalhar-se para outras regiões do corpo, também conhecido como metástase, uma das principais causas de morte por câncer.

Existem diversas formas de câncer que se diferenciam a partir dos tipos de células e pontos de partida. Quando começam nos tecidos conjuntivos são chamados de sarcoma. No entanto são denominados carcinomas quando se apresentam inicialmente nos tecidos epiteliais (INCA, 2019).

Em 2018, o câncer de fígado foi o sétimo tipo de câncer com maior incidência no mundo (9,3%) e o quarto em mortalidade (8,5%) (WHO, 2020b; 2020c). Porém, essa não foi a realidade no Brasil neste ano, uma vez que o câncer de fígado não apareceu no relatório estatístico de perfil regional do câncer da WHO (2020d), mas ocupou a décima terceira posição em incidência (4,7%) e foi o sétimo tipo de câncer (4,4%) que mais matou no país, em ambos os relatórios acompanhado do câncer de pâncreas (WHO, 2020a).

O carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma intra-hepático são os dois principais tipos de câncer hepático primário (BRAY et al., 2018), sendo que a combinação desses dois tipos resulta em outro raro câncer hepático, mostrando diferenciação hepatocelular e biliar (CONNELL et al., 2016). O colangiocarcinoma é uma forma de tumor com origem no epitélio dos ductos biliares intra- ou extra-hepáticos (LUCCHESI et al., 2018). Anos antes, Sekiya e Suzuki (2012) indicaram que a origem celular do colangiocarcinoma intra-hepático ainda seria incerta, apesar de Lee et al. (2009) já terem sugerido que hepatócitos e células do ducto biliar

diferenciavam-se a partir das mesmas células progenitoras, indicando que o colangiocarcinoma intra-hepático e o carcinoma hepatocelular compartilhavam um processo comum da doença.

Considerado um tipo de tumor muito raro e com diagnóstico tardio, o colangiocarcinoma possui dois potenciais precursores, as neoplasias intraepitelial e a papilar intraductal, além de diversos fatores que promovem inflamação crônica e proliferação do epitélio biliar a longo prazo, como diabetes, cirrose, obesidade, tabagismo, hepatite C, entre outras doenças já conhecidas, com variações conforme diferentes regiões geográficas e grupos étnicos dos pacientes (EL-SERAG; RUDOLPH, 2007; MARQUES, 2019).

Dando ênfase ao colangiocarcinoma intra-hepático, Welzel et al. (2007) apontam o diabetes, a doença hepática alcoólica e a obesidade como doenças precursoras desse tipo de câncer. No entanto, Lazaridis e Gores (2005) afirmam que a maioria dos tipos de colangiocarcinoma ainda possui causa não revelada e apesar dos fatores de riscos conhecidos, diversos indivíduos não apresentam associações a nenhum deles.

O perfil ômico pode oferecer uma compreensão mais clara da carcinogênese, da classificação do câncer e da estratégia de tratamento, incluindo os subtipos de colangiocarcinoma intra-hepático, distal e peri-hilar, e câncer da vesícula biliar ou do ducto cístico. No entanto, existem poucos dados na literatura sobre as alterações nos diferentes níveis ômicos e sua conexão, apesar de Chen et al. (2020) revelarem que a alteração no genoma e transcriptoma de colangiocarcinoma está altamente correlacionada à mutações gênicas importantes podendo afetar a expressão de outros genes, bem como demonstraram diferentes mecanismos de recorrência do tumor hepatocelular a partir do sequenciamento completo buscando variantes de nucleotídeo único e variação no número de cópias (CHEN et al. 2018). Ainda, Wardell et al. (2018) analisando características epigenéticas sugeriram a origem do colangiocarcinoma intra-hepático em hepatócitos relacionados à hepatite, corroborando com a

literatura citada acima. Estes autores concluíram com base em análises genéticas que os cânceres de vias biliares têm características genéticas distintas.

Murakami et al. (2015) analisando diversas vias metabólicas do colangiocarcinoma intra-hepático e carcinoma hepatocelular notaram uma abundante expressão de micro RNAs (miRNAs). Alguns RNAm e RNAt também se revelaram importantes marcadores. Informações moleculares do tecido tumoral garantem uma precisão no diagnóstico de colangiocarcinoma intra-hepático, porém é necessário entender a origem das células epiteliais hepáticas e dos ductos biliares intra-hepáticos, uma vez que apresentam um precursor bipotente comum, os hepatoblastos, No caso do carcinoma hepatocelular, o desenvolvimento ocorre após a hepatite C, dificultando a conclusão de sua origem e sugerindo que o tumor se forma a partir de hepatócitos transformados (SHAIB et al., 2005).

Muitos genes estão envolvidos no desenvolvimento do câncer, alguns conhecidos como genes supressores de tumor que causam o aparecimento de neoplasias no local onde são inibidos, porque seu desaparecimento resulta em um crescimento desordenado das células (CUSTÓDIO, 2006). Algumas proteínas podem agir da mesma maneira, como por exemplo a proteína PTEN (*phosphatase and tensin homologue*), a qual é supressora de tumor regulando negativamente a via de sinalização AKT/PKB (AKT/Proteína quinase B), resultando na ativação de diversas proteínas que aumentam o crescimento tumoral (SOUZA et al., 2014).

Neste contexto, Xue et al. (2019) identificaram o gene *PTEN*, juntamente com outros genes recorrentemente relatados nos primeiros tipos de câncer de fígado, como potenciais genes direcionadores do raro câncer hepático. Wardell et al. (2018) também relataram mutação do gene *PTEN* em cânceres de vias biliares, porém em menor frequência comparado com outros genes potenciais.

O gene *PTEN* codifica uma enzima capaz de controlar o crescimento das células, sinalizando o término da divisão e conseqüentemente a apoptose das células. Podendo ser

expressa em diversos tecidos, linhagens celulares, cânceres e outros (metástases, transplantes de órgãos e tratamentos variados). A enzima PTEN funciona como uma fosfatase, capaz de regular as funções e também está relacionada com mais de cem processos fisiológicos e bioquímicos no organismo humano, entre eles a angiogênese, o desenvolvimento cardíaco, a migração celular, a desfosforilação de proteínas, a transmissão sináptica rítmica, o aprendizado e memória, e a regulação negativa do envelhecimento celular (CANCER GENETICS WEB, 2020).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar o perfil de expressão do gene e da proteína PTEN nos cânceres hepáticos primários e sua potencialidade no diagnóstico, prognóstico e tratamento.

Objetivos específicos

- Revelar as características genéticas e bioquímicas da PTEN, analisando suas rotas biológicas e localização celular utilizando ferramentas de bioinformática disponíveis em bancos de dados de livre acesso;
- Correlacionar informações sobre o gene e a proteína PTEN com o carcinoma hepatocelular e o colangiocarcinoma.

METODOLOGIA

Estudo exploratório e descritivo foi realizado no período de Outubro/2020 a Dezembro/2020, baseando-se em revisão bibliográfica e no uso de ferramentas de bioinformática para obtenção de dados sobre o colangiocarcinoma intra-hepático e a PTEN.

A revisão da literatura foi realizada nas bases de dados Google Scholar, SciELO, PubMed e Periódicos Capes utilizando como entrada as seguintes palavras-chave: “ducto”, “biliar”, “câncer”, “bioinformática”, “colangiocarcinoma” e “fígado”, e seus correspondentes em inglês. Além disso, os termos foram combinados utilizando o operador booleano “AND” para compor a estratégia de busca.

A localização cromossômica do gene *PTEN*, bem como informações genéticas gerais sobre o colangiocarcinoma foram obtidas a partir do banco de dados *Genetics Home References* (<https://ghr.nlm.nih.gov/>) (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2020). A sequência de nucleotídeos foi levantada no DBGET - *Integrated Database Retrieval System* no Banco de dados do GenomeNet (<https://www.genome.jp/>).

A sequência de resíduos de aminoácidos (FASTA) da PTEN de *Homo sapiens* foi obtida no banco de dados NCBI - *National Center of Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e no UniProtKB - UniProt Knowledgebase (<https://www.uniprot.org/>), e a estrutura proteica cristalizada em 3D foi levantada no PDB - *Protein DataBase* (<https://www.rcsb.org/>) (BERMAN et al., 2000) e no Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) (KOPP; SCHWEDE, 2004; WATERHOUSE et al., 2018), respectivamente. A ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) (GASTEIGER et al., 2005) no banco de dados ExPasy, foi utilizada para revelar as características moleculares, como o percentual individual de aminoácidos na composição da proteína, peso molecular e composição atômica.

Para levantar a localização expressa do RNAm em diferentes tecidos e amostras celulares em humanos, o *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) foi acessado selecionando a chave PTEN em “*protein summary*”, restringindo o dado para “*RNA data*” (UHLÉN et al., 2015).

Para explorar as mutações somáticas no *PTEN* no câncer hepatocelular e colangiocarcinoma, o banco de dados COSMIC - *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) foi acessado restringindo a busca para “PTEN”, “*liver*”, “*carcinoma*” e os dois tipos de câncer hepático (TATE et al., 2019).

Para obtenção do mapa da via de sinalização do colangiocarcinoma intra-hepático foi utilizado o banco de dados do KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (<https://www.genome.jp/kegg/>) (KANEHISA; GOTO, 2000), restringindo em “*Kegg Pathway*”. Para busca de dados, as entradas a serem utilizadas foram os termos “*cholangiocarcinoma*”, “*bile duct cancer*” e “*hepatocellular carcinoma*” selecionando o resultado que conteve a melhor descrição para cada busca, todos no conjunto de “*Kegg Orthology*”.

A plataforma web PSORT - *Protein Subcellular Localization Prediction Tool* (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) (NAKAI; HORTON, 1999) foi utilizada para predição da localização celular da PTEN, selecionando a opção “*yeast/animal*” como sequência de entrada para a busca da proteína. A localização subcelular também foi predita a partir da sequência de aminoácidos utilizando o software CELLO versão 2.0 calibrado para análise específica em eucarioto (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (YU; LIN; HWANG, 2004; YU et al., 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os muitos papéis importantes da/ o PTEN abrangem diversos processos biológicos, incluindo parada do ciclo celular em G1, apoptose, inibição da migração celular, disseminação, quimiotaxia e formação de adesão focal (WAITE; ENG, 2002).

A proteína PTEN pertence à família de proteínas tirosina-fosfatases (PTP) e é classificada como uma enzima hidrolase, tendo como principais funções a supressão tumoral e a motilidade celular. As sequências de nucleotídeos e de resíduos de aminoácidos da PTEN em *Homo sapiens* estão postas nas tabelas 1 e 2, respectivamente, as quais foram obtidas no NCBI.

Tabela 1 - Características do gene *PTEN*, incluindo o código de acesso, nome de descrição e sua sequência de nucleotídeos

| Código de acesso NCBI | Nome | Sequência de nucleotídeos |
|------------------------------|--|---|
| 5728 | phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase <i>PTEN</i> | atgacagccatcatcaaagagatcgttagcagaaacaaaaggagatat caagaggatggattcgacttagacttgacctatatttatccaaacatt attgctatgggatttctcgcagaaagacttgaaggcgtatacaggaac aatattgatgatgtagtaagggttttggattcaaagcataaaaacat tacaagatatacaaatctttgtgctgaaagacattatgacaccgccaaa ttaaattgcagagttgcacaatatccttttgaagaccataaccacca cagctagaacttatcaaacccttttgtgaagatcttgaccaatggcta agtgaagatgacaatcatgttgacgaattcactgtaaagctggaaag ggacgaactgggtgtaatgatatgtgcatatattatcacatcggggcaaa tttttaaaggcacaagaggccctagatttctatggggaagtaaggacc agagacaaaaagggagtaactattcccagtcagaggcgctatgtgtat tattatagctacctgttaaagaatcatctggattatagaccagtgga ctgtgtttcacaagatgatggttgaaactattccaatgttcagtggc ggaacttgcaatcctcagtttgggtctgccagctaaaggtgaagata tattcctccaattcaggacccacacgacgggaagacaagttcatgtac tttgagttccctcagccgttacctgtgtggtgatatacaaagtagag ttcttccacaaacagaacaagatgctaaaaaaggacaaaatgtttcac ttttgggtaaatacattcttcataaccaggaccagaggaaacctcagaa aaagtagaaaatggaagtctatgtgatcaagaaatcgatagcattttgc agtatagagcgtgcagataatgacaaggaatatctagtacttacttta acaaaaaatgatcttgacaaaagcaataaaagacaaaagccaaccgatac ttttctccaaattttaagggtgaagctgtacttcacaaaaacagtagag gagccgtcaaatccagaggctagcagttcaacttctgtaacaccagat gttagtgacaatgaacctgatcattatagatattctgacaccactgac tctgatccagagaatgaaccttttggatgaagatcagcatacacaatt acaaaagtctga |

Fonte: Os autores. Tabela construída com dados extraídos dos NCBI (2020a) e GenomeNet (2020).

O *PTEN* foi identificado pela primeira vez em 1997 por três grupos independentes e por estratégias diferentes. Dois grupos usaram clonagem posicional para mapear o gene, enquanto Li et al. (1997) revelaram a existência de um novo gene supressor de tumor, o *PTEN*, em câncer de mama. Steck et al. (1997) divulgaram o gene *MMAC1* similar ao *PTEN*. Já o terceiro grupo se baseou nas propriedades bioquímicas (LI; SUN, 1997) e, desde então, vários dados foram apresentados e revelam o papel de supressor tumoral *in vitro* e *in vivo*.

O gene *PTEN* em *Homo sapiens* está localizado na posição 23.31 no braço longo do cromossomo 10 (Figura 1), sua sequência transcrita tem como código de acesso 5728 no NCBI e revela 1.212 nucleotídeos no GenomeNet (Tabela 1). O gene foi mapeado neste cromossomo por Steck et al. (1997). Sharrard e Maitland (2000) mostraram que o gene *PTEN* contém 9 exons mais um exon variável com cinco bases que é ignorado no transcrito principal. Além disso, a extremidade 3- do exon 8 está sujeita a *splicing* alternativo.

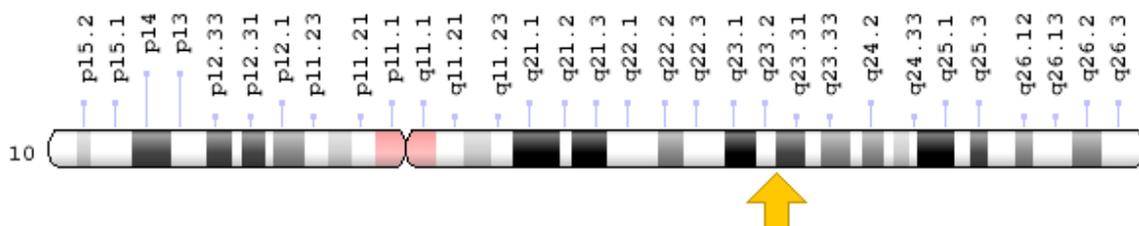


Figura 1 - Localização cromossômica do gene *PTEN*.

Fonte: *Chromosome Disorder Outreach* (2020).

Visto que existem 830 depósitos de sequências e estruturas da proteína *PTEN* para *Homo sapiens* no NCBI (até a presente data), utilizaram-se como critérios de escolha a quantidade de resíduos de aminoácidos, data de publicação, quantidade de referências e compatibilidade de informação com outros bancos de dados. A sequência da proteína *PTEN* em *Homo sapiens* no NCBI tem como código de acesso AAD38372 e apresenta 403 aminoácidos, massa molecular de 47,16 kDa e ponto isoelétrico de 5,94 (Tabela 2).

Tabela 2 - Informações bioquímicas da proteína PTEN, incluindo o código de acesso no NCBI e PDB, número de resíduos de aminoácidos e as sequências primária (FASTA) e terciária (Estrutura)

| Código de acesso NCBI PDB | Resíduos de aminoácidos | Sequência FASTA | Estrutura |
|----------------------------------|--------------------------------|---|---|
| AAD38372 1D5R | 403 | <pre>>AAD38372.1 PTEN [Homo sapiens] MTAIIKEIVSRNKRRYQEDGFDDLTYIYPN IIAMGFPAERLEGVYRNNIDVVRFLDSKHK NHYKIYNLCAERHYDTAKFNCRVAQYPFEDH NPPQLELIKPFCELDLQWLSEDDNHVAAIHC KAGKGRGTGMICAYLLHRGKFLKAQEALDFY GEVRTRDKKGVTI PSQRRYVYYSYLLKNHL DYRPVALLFHKMMFETIPMFSGGTCNPQFVV CQLKVKIYSSNSGPTRRREDFMYFEFPQPLP VCGDIKVEFFHKQNKMLKDKMFWVNTFF IPGPEETSEKVENGLCDQEIDSICSIERAD NDKEYLVLTLTKNLDKANKDKANRYFSPNF KVKLYFTKTVEEPSNPEASSSTSVPDVSDN EPDHYRYSDT TSDPENEPFDEDQHTQITKV</pre> |  |

Fonte: Os autores. Tabela construída com dados extraídos do NCBI (2020b) e PDB (2020).

A análise *in silico* da sequência FASTA revela a composição dos principais aminoácidos presentes na PTEN, sendo Lys (8,4%), Asp (8,2%) e Glu (7,2%) os mais prevalentes, e Met (2,2%) e Trp (0,5%) aqueles que aparecem em menor frequência, revelando assim sua característica polar com cargas positivas e negativas.

A estrutura terciária extraída do PDB (1D5R) foi obtida pelo método de difração de raios X (Tabela 2). No Swiss-Model no ExPasy a PTEN de *Homo sapiens* foi identificada pelo código P60484. A família das proteínas tirosina fosfatases, como é o caso da PTEN, reúne as enzimas responsáveis pela remoção do grupo fosfato de resíduos de tirosina em proteínas. O sítio catalítico dessa família é altamente conservado por uma sequência consenso composta pelos resíduos [I/V] HCXXGXXR[S/T] (TONKS, 2013). Esta sequência forma o *loop* catalítico, responsável pela remoção do grupo fosfato do resíduo de tirosina da proteína substrato (SCORSATO, 2015).

Tabela 3 - Composição de aminoácidos da sequência primária de PTEN

| Aminoácido | Abreviatura e sigla | Quantidade | Frequência |
|-------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|
| Lisina | Lys (K) | 34 | 8,4% |
| Aspartato | Asp (D) | 33 | 8,2% |
| Glutamato | Glu (E) | 29 | 7,2% |
| Leucina | Leu (L) | 27 | 6,7% |
| Fenilalanina | Phe (F) | 25 | 6,2% |
| Valina | Val (V) | 24 | 6,0% |
| Asparagina | Asn (N) | 23 | 5,7% |
| Prolina | Pro (P) | 23 | 5,7% |
| Tirosina | Tyr (Y) | 23 | 5,7% |
| Serina | Ser (S) | 22 | 5,5% |
| Treonina | Thr (T) | 21 | 5,2% |
| Isoleucina | Ile (I) | 20 | 5,0% |
| Arginina | Arg (R) | 20 | 5,0% |
| Alanina | Ala (A) | 17 | 4,2% |
| Glicina | Gly (G) | 15 | 3,7% |
| Glutamina | Gln (Q) | 13 | 3,2% |
| Histidina | His (H) | 13 | 3,2% |
| Cisteína | Cys (C) | 10 | 2,5% |
| Metionina | Met (M) | 9 | 2,2% |
| Triptofano | Trp (W) | 2 | 0,5% |

Fonte: Os autores. Tabela construída com dados extraídos do ProtParam (2020) com base na sequência FASTA.

A análise da estrutura secundária da PTEN (Figura 2A) no banco de dados PDB (BERMAN et al., 2000) com código de acesso 1D5R e nomeada como PTEN fosfoinositol fosfatase, alinha-se com a sequência P60484 depositada no Uniprot (Figura 2B) em apenas 324 resíduos de aminoácidos e nomeada como fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato 3-fosfatase e específica para proteína fosfatase PTEN, revelou a presença e localização de arranjos do tipo

alfa-hélice (nove unidades) e conformação beta (quatorze unidades), os quais podem ser visualizados na estrutura posta na Tabela 2. Dentre os resíduos presentes na sequência, apenas um é modificado, sendo a fosfoserina localizada na posição 288 (Figura 2A) em contraste de dez resíduos modificados na sequência da PTEN depositada no Uniprot (Figura 2B), sendo uma N-acetil-treonina na posição 2, quatro resíduos de fosfoserina nas posições 294, 370, 380 e 385, uma fosfotirosina na posição 336 e quatro resíduos de fosfotreonina nas posições 366, 382, 383 e 401.

É enorme a quantidade de bancos de dados e as suas informações são muito variadas. Muitas vezes esses dados não são precisos e contêm inconsistências. Por isso, estudiosos na área de bioinformática recomendam o uso de fontes confiáveis e revisadas. Os bancos de dados utilizados neste estudo de levantamento genético e bioquímico do *PTEN* são considerados os principais na área. O UniProtKB é uma base de conhecimento de sequências de proteínas abrangente e anotada, enquanto o NCBI fornece um grande conjunto de recursos online para informações e dados biológicos. Além deles, lista-se também o KEGG, uma coleção de bancos de dados que abrange funções e utilidades de sistemas biológicos, sendo as proteínas associadas a vias metabólicas, reações bioquímicas, doenças, entre outros (LENZ, 2020).

Além dos bancos de dados citados, existem outros mais específicos com variadas classificações de sequências de nucleotídeos e proteínas. Assim, a confiabilidade das fontes de dados é fundamental e a validação dos dados obtidos em um banco de dados se faz necessária em outros bancos (LENZ, 2020). A curadoria manual é frequentemente usada para avaliar vários tipos de evidências e melhorar as previsões automatizadas, como foi o caso dos dois depósitos de sequência primária da proteína PTEN no PDB e no Uniprot. Em última análise, a verificação experimental é a única maneira de garantir a estrutura correta.



Figura 2 - Características das sequências da PTEN depositadas nos bancos de dados PDB (A) e Uniprot (B).

Fonte: Adaptada de PDB (2020).

O ácido tartárico é um ácido orgânico cristalino, descrito como um alfa-hidroxicarboxílico, diprótico e aldárico em características ácidas, derivado da dihidroxila do ácido succínico (DRUGBANK, 2020). Esse ácido é um dos ligantes da proteína PTEN, na qual existem oito sítios de ligação, sendo eles nas posições Asp86, His87, Cys118, Lys119, Ala120, Gly123, Arg124 e Gln165 (Figura 2A).

A sequência depositada no PDB também revelou a presença de um único sítio ativo, nomeado como fosfocisteína intermediária na posição Cys118 (Figura 2A), uma informação conflitante quando se compara com o depósito da mesma sequência no Uniprot, onde o sítio ativo é descrito estando localizado na posição Cys124 (Figura 2B). Em busca pela estrutura detalhada da PTEN no banco de dados SwissModel (Figura 3), o sítio ativo é revelado como descrito por Lee et al. (1999), com um motivo HCXXGXXR e os resíduos Cys-124 e Arg-130 como os aminoácidos essenciais para a catálise e os resíduos His-123 e Gly-127 importantes para a conformação do *loop* P. Interessantemente, as estruturas depositadas no Uniprot (P60484) e no PDB (1D5R) não se alinham integralmente, mas somente em 324 resíduos de aminoácidos, como pode ser visto nas figuras 2 e 3.

Não há um consenso sobre a estrutura dos domínios da proteína PTEN, variando entre os resíduos 1-185 e 7-185 para o N-terminal e entre os resíduos 186-351 e 186-403 para o domínio C-terminal (LEE et al., 1999; WAITE; ENG, 2002). Segundo Waite; Eng (2002), o domínio C-terminal contém o domínio C2 de ligação à membrana e desfosforilação de PIP3 (Lee et al. 1999), o domínio PEST na cauda carboxiterminal (resíduos 350-375 e 379-396) que regulam a estabilidade da proteína e o domínio PDZ, importante nas interações proteína-proteína (SONG; SALMENA; PANDOLFI, 2012). Ainda, há a descrição de mais dois domínios, domínio de ligação a PIP2 e o domínio fosfatase (JOTTA, 2012). Os autores Dirican; Akkiprik (2017) revelaram em esquema a estrutura dos domínios da PTEN, como pode ser visto na Figura 4.

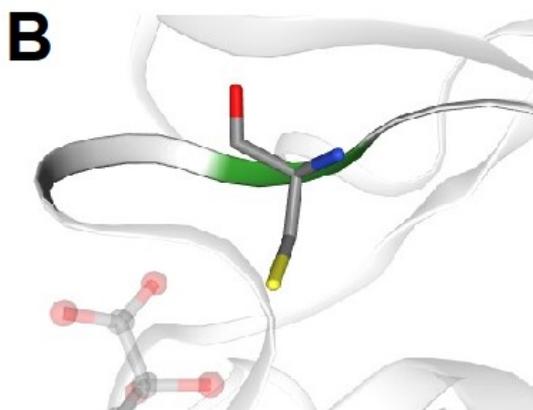
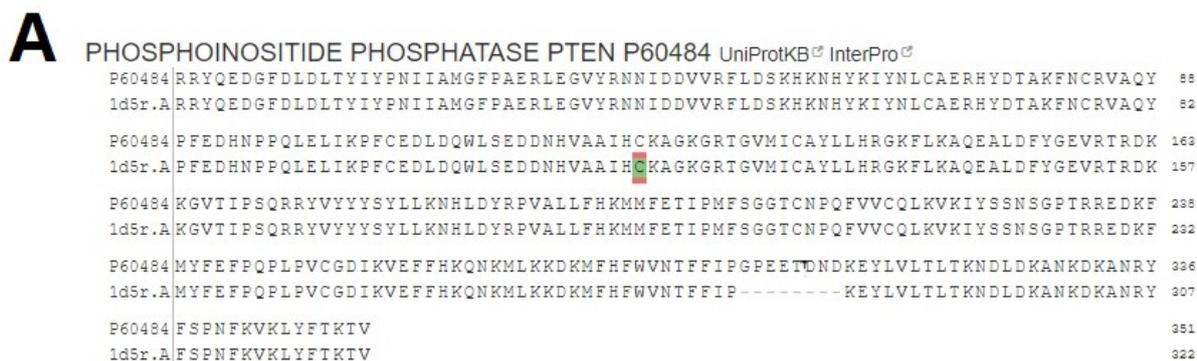


Figura 3 - Sequência de alinhamento das estruturas da PTEN depositadas no PDB (1D5R) e no Uniprot (P60484) (A). Detalhe do resíduo de cisteína presente no sítio ativo (B).

Fonte: Adaptada de SWISS-MODEL - Uniprot 60484 (2020).

Analisando as sequências alinhadas do PDB (Figura 2A) e Uniprot (Figura 2B) há a descrição de dois domínios: 1) a fosfatase tensina N-terminal entre os resíduos 8-179 e 4-185, respectivamente, e 2) C2 tensina C-terminal entre os resíduos 184-324, para o primeiro e 190-350, para o segundo. Na figura 2B também é possível visualizar a presença de apenas um iniciador de metionina na posição 1.



Figura 4 - Estrutura dos domínios da PTEN. PBD- domínio fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PDZ- domínio de ligação de proteína (PSD-95/Dlg/ZO-1).

Fonte: Adaptada de Dirican; Akkiprik (2017).

Dados levantados a partir do PSORT revelaram alta predição à localização citoplasmática (60,9%) e baixa para nuclear (34,8%), enquanto a validação dos resultados pelo CELLO indicou alta predição à localização nuclear (3.330) e baixa para citoplasmática (1.107). Segundo anotação no UniProt (P60484), a PTEN já foi localizada no núcleo (MEHENNI et al., 2005; SONG et al., 2008; THEMSCHE et al., 2009; HOWITT et al., 2015), no citoplasma (LI; SUN, 1997; MEHENNI et al., 2005; SONG et al., 2008; THEMSCHE et al., 2009; HOWITT et al., 2015) e na região extracelular (HOPKINS et al., 2013; LIANG et al., 2014).

Segundo Jotta (2012), a distribuição intracelular da proteína PTEN entre o núcleo e citoplasma da célula é determinada pela presença de domínio de localização nuclear na região N-terminal e de domínios de exclusão nuclear nas regiões C2 e C-terminal. A localização de PTEN no núcleo é dependente da conformação da proteína (GIL et al., 2006) e é onde ela regula, independentemente da sua atividade fosfatase, o ciclo celular, promovendo a estabilidade genômica e o reparo do DNA (SHEN et al., 2007). Vale destacar que o recrutamento de PTEN para o núcleo reduz sua habilidade em antagonizar PI3K (LINDSAY et al., 2006) e a sua ausência nesta região celular tem sido associada com cânceres mais agressivos (SONG et al., 2012).

A análise transcriptômica (RNA-seq) extraída do NCBI (2020a) realizada em 27 tecidos diferentes, com a finalidade de determinar a especificidade do gene codificador da proteína PTEN revelou que o gene é altamente expresso no organismo humano e em diferentes tecidos (Figura 5), sendo majoritariamente no tecido adiposo (média RPKM 42.812 ± 10.554) ao contrário do pâncreas com menor expressão (média RPKM $3.688 \pm 0,299$). O fígado, como outros tecidos analisados, possui expressão mediana do gene *PTEN* (média RPKM $16.479 \pm 2,99$).

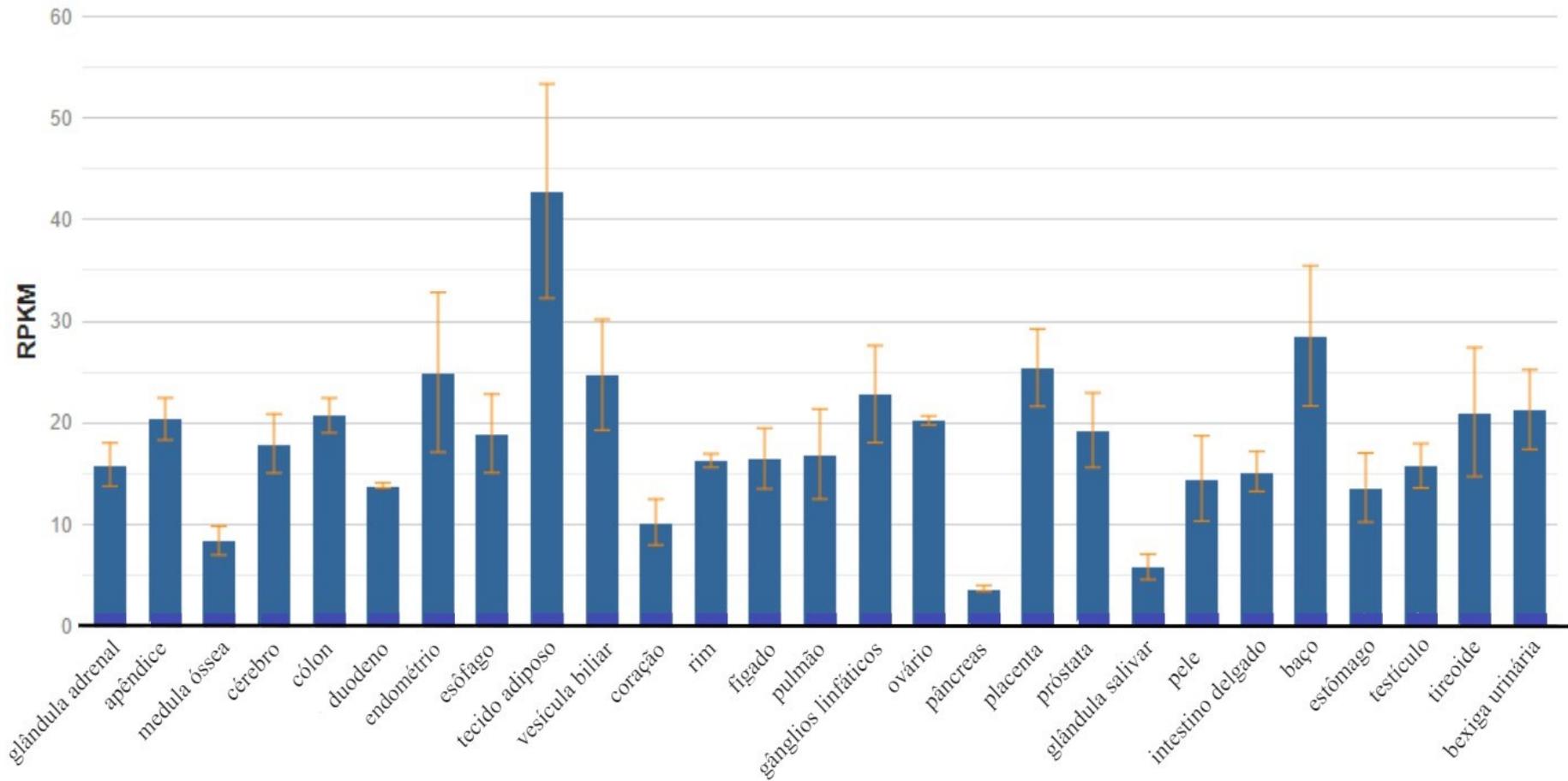


Figura 5 - Análise transcriptômica do gene *PTEN* de *Homo sapiens* (Gene ID: 5728) em 27 tecidos humanos expresso em RPKM (*reads per kilobase por milion mapped reads*), sem especificação do estágio de desenvolvimento.

Fonte: Adaptada de NCBI (2020a).

Os dados extraídos do NCBI (2020) foram gerados a partir de análise transcriptômica quantitativa (RNA-Seq) realizada por Fagerberg et al. (2014) para classificar a expressão específica de genes em um conjunto representativo dos principais órgãos e tecidos humanos, combinando com análise em anticorpos.

Com base nos resultados obtidos, Fagerberg et al. (2014) criaram uma nova versão do *The Human Protein Atlas*, no qual é possível obter mais informações sobre a expressão do gene *PTEN* (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000171862-PTEN>). A especificidade tecidual (baixa, expresso em todos os tecidos), no cérebro (baixa) e no sangue (em neutrófilos), localização extracelular (secretado) e subcelular (nucleoplasma e citosol), prognóstico tumoral (marcador em tumor renal, baixa especificidade, detectado em todos os tipos de câncer), localização predita (intracelular ou secretada), processos biológicos (apoptose, metabolismo de lipídeos e neurogênese) e doenças envolvidas (autismo, cânceres, mutações e supressor de tumor), ligante (ligante de lipídio), e função proteica (supressor de tumor) e molecular (proteína fosfatase, hidrolase). Segundo Fagerberg et al. (2014), o mapa de expressão humana integrativa pode ser usado como um ponto de partida para explorar os constituintes moleculares do corpo humano.

Ainda no *The Human Protein Atlas* é possível obter um resumo de expressão do gene *PTEN* em 55 diferentes tecidos e seis tipos celulares do sangue (Figura 6), no qual o timo aparece como o tecido com maior expressão (NX: 49,7), em contraste com as células mononucleadas do sangue periférico que apresentam a menor expressão (NX: 2,0), enquanto o fígado também expressa o gene *PTEN*, porém de maneira mediana comparado com outros tecidos e grupos celulares (NX: 32,4).

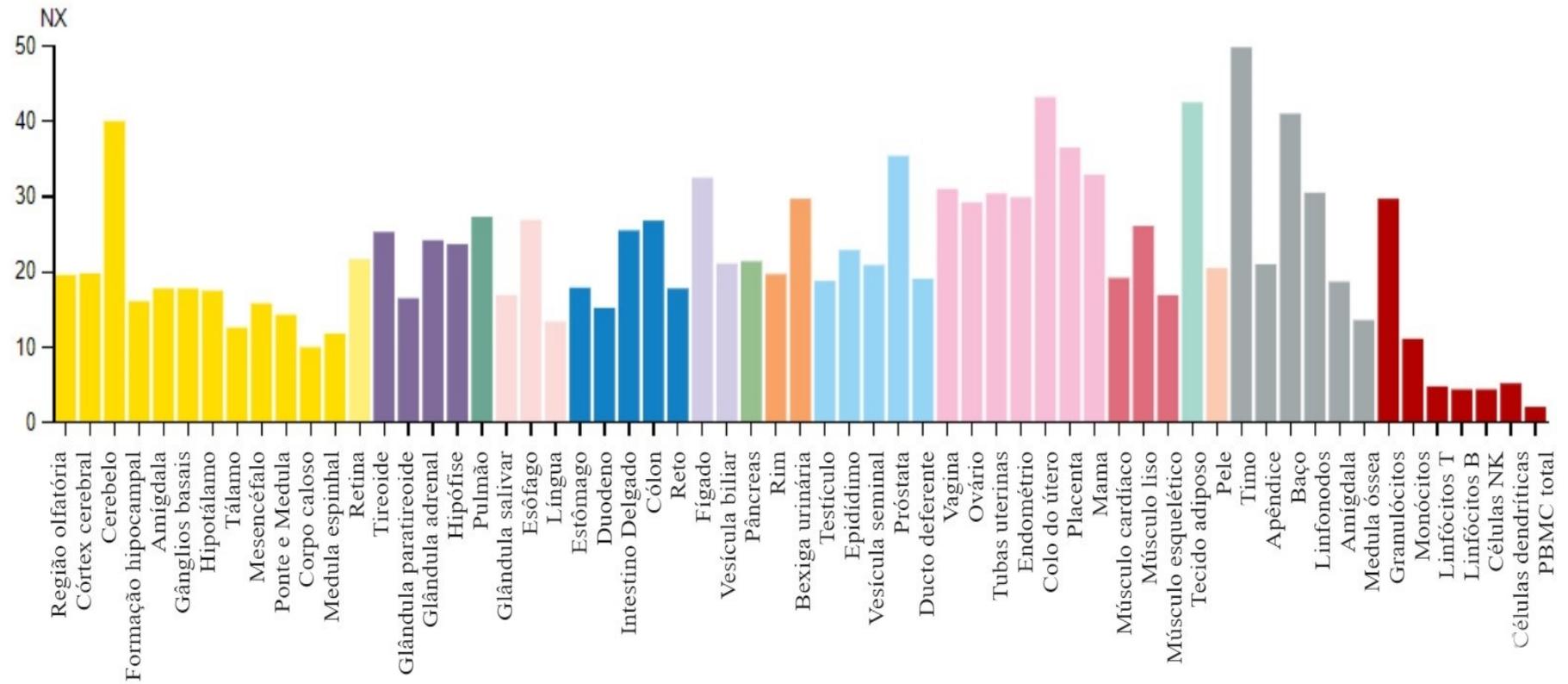


Figura 6 - Expressão do gene *PTEN* de *Homo sapiens* em 55 diferentes tecidos e seis tipos celulares do sangue expresso em NX (expressão normalizada).

Fonte: Adaptada de *The Human Protein Atlas* (2020).

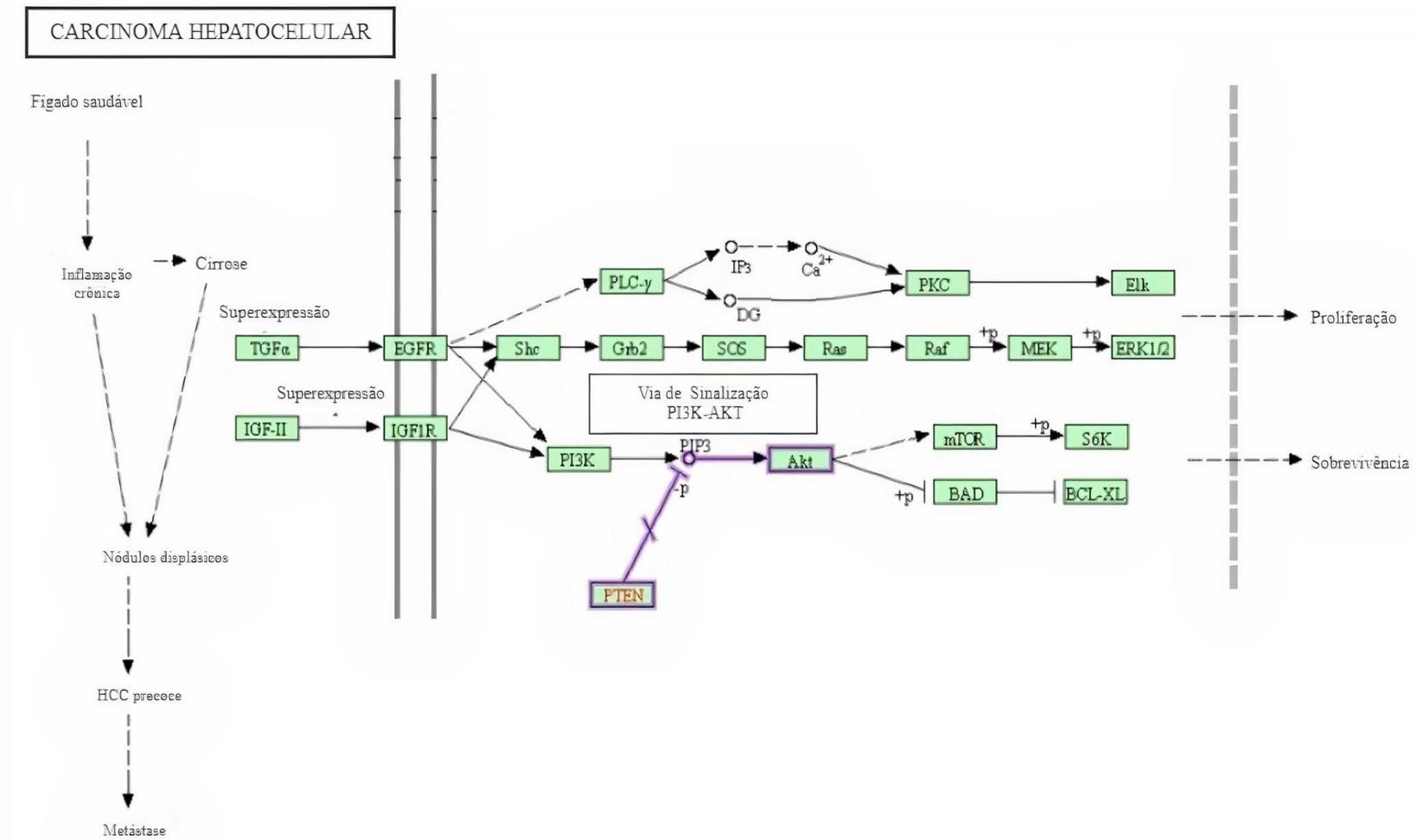
O carcinoma hepatocelular é um importante tipo de câncer primário do fígado, sendo também um dos raros tumores humanos relacionados a fatores virais. Dados extraídos do KEGG (2020a) revelam que as hepatites B e C, assim como o alcoolismo e o tabagismo causam diversas alterações genéticas no fígado saudável (Figura 7). Entretanto, em condição de inflamação crônica e cirrose, a superexpressão de marcadores, como TGF α e IGF-II, resulta na ativação da via de sinalização PI3K/AKT.

Segundo Li; Ross (2007) *PTEN* é um grande influenciador no funcionamento da via PI3K/AKT. Por ser um supressor de tumor, a PTEN tem como função regular a atividade e o nível de expressão das proteínas envolvidas nessa via, resultando na sobrevivência celular (Figura 7).

Desta maneira, a PTEN atua como um regulador da via PI3K/AKT, desfosforilando a PI3P, diminuindo seus níveis celulares e resultando na regulação negativa de AKT. Para melhor entendimento e visualização de maneira integrada no organismo humano, a via foi extraída do banco de dados KEGG (2020b).

A estimulação da GPCR (receptor acoplado à proteína G) ativa a PI3K (fosfoinositídeo-3-quinase), levando à produção de PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato) na membrana plasmática. O PIP3 direciona a AKT à membrana celular, onde é fosforilada e ativada pela PDK1, uma quinase fosfoinositol-dependente.

O gene *PTEN* regula negativamente a via PI3K/AKT (Figura 8). A fosfatase codificada pelo gene *PTEN* promove a desfosforilação da PIP3, com ação na atividade de PI3K convertendo PIP3 a PIP2, impedindo assim a ativação da AKT, estimulando a apoptose e bloqueando a proliferação e o crescimento celular tumoral (COSTA, 2012).

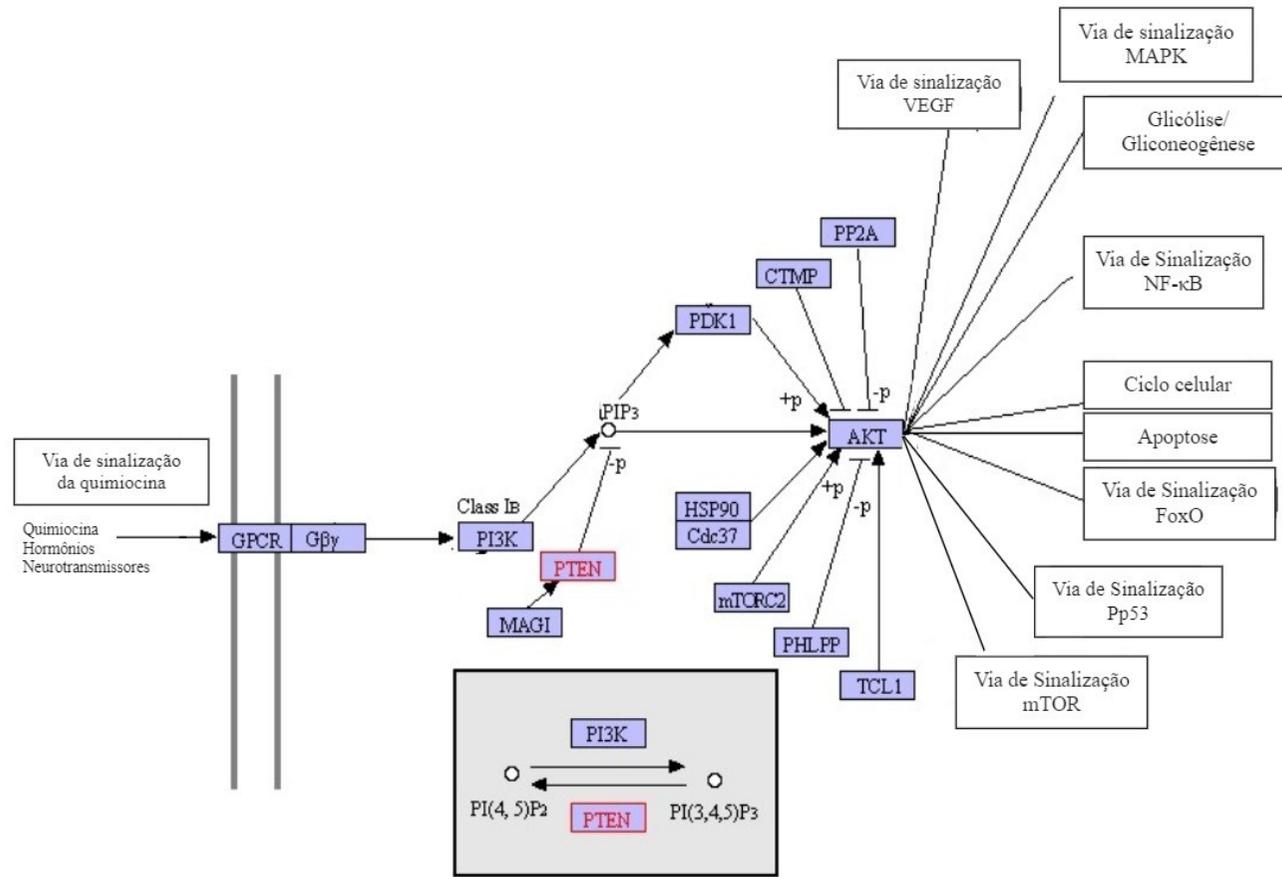


05225 10/9/19
(c) Kancheva Laboratories

Figura 7 - Vias de sinalização do carcinoma hepatocelular.

Fonte: Adaptada de KEGG (2020a).

VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT



04151 10/3/19
(c) Kanehisa Laboratories

miro

Figura 8 - Via de sinalização PI3K/AKT.

Fonte: Adaptada de KEGG (2020b).

Na figura 7, MAPK, RAS, RAF, MEK e ERK são ativados sequencialmente pela quinase regulando vários processos celulares vitais para a célula maligna, revelando a importante participação da PTEN na regulação da evolução do carcinoma hepatocelular em geral (CARMO, 2014).

A expressão diminuída da proteína PTEN gera níveis aumentados de AKT e inibição da apoptose e dos mecanismos de controle celular. Por outro lado, sua ativação resulta em fosforilação de efetores proteicos, dentre os quais está o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que têm função estabelecida na progressão da carcinogênese humana.

Assim, a perda de função do *PTEN* perpetua a ativação da AKT, criando um mecanismo de auto-ativação cíclica, resultando em mecanismo de escape da morte celular programada e da parada do ciclo celular em G1, propiciando o crescimento tumoral.

A partir de levantamento realizado no banco de dados COSMIC (2020a) observou-se a expressão diferencial dos 20 principais genes em amostras de colangiocarcinoma com ou sem mutação, estando o *PTEN* na décima posição, com frequência de 9%.

Segundo dados de mutagênese do Uniprot (P60484) existem 24 sítios possíveis de mutação na PTEN, enquanto pelo PDB (1D5R) são apenas 13 sítios. Explorando as informações no COSMIC e filtrando para dados especificamente em colangiocarcinoma hepatocelular, na PTEN é possível notar que existem três tipos de mutação do tipo *missense* observadas no gene, com destaque para substituição G > T, sendo a frequência expressa na figura 9.

Mutações do tipo *missense* alteram a funcionalidade da proteína (ALI; SCHRIML; DEAN, 1999), já que havendo a substituição de uma base nitrogenada e resultando em um novo códon, o aminoácido é alterado apenas nesta posição. Isso é, Arg130 pode ser alterada para Gln130, Pro130, Leu130, Gly130 e Ser130, e Arg173 pode ser substituída para Cys173 e His173. Essas alterações foram levantadas com base na sequência depositada no Uniprot (P60484) e dados do COSMIC-3D.

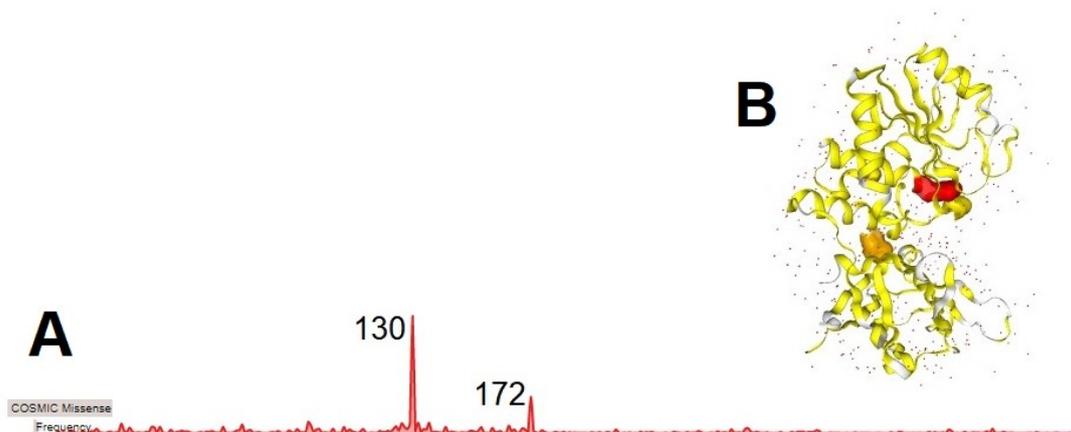


Figura 9 - Localização e intensidade da frequência das mutações *missense* na sequência da proteína PTEN e sua posição na estrutura tridimensional.

Fonte: Adaptada de COSMIC (2020b).

Interessantemente, todas as substituições possíveis estão no domínio catalítico da PTEN entre os resíduos 67-173. Segundo o COSMIC-3D, em genes supressores de tumor, mudanças em resíduos de aminoácidos resultam em uma perda de carga positiva, uma vez que o aminoácido arginina pertence à classe dos aminoácidos polares carregados positivamente. Isso pode impactar na alteração da função e/ou enovelamento da estrutura proteica, ainda mais se tratando de uma região catalítica da proteína PTEN. Entretanto, a função de regulação da via AKT/PKB pela desfosforilação da PIP3 não é alterada mesmo com as possíveis mutações *missense*, porque o domínio que permite essa regulação é o C2 que é constituído pelos resíduos de aminoácidos 182-320.

Um outro detalhe importante como resultado da mutação *missense* presente na PTEN é que a substituição do aminoácido Arg pela Gly ou Pro pode também interferir na flexibilidade ou rigidez do enovelamento proteico.

Deve-se considerar ainda que o aparecimento de miRNA pode ser observado significativamente em diversos tumores. A figura 10 representa a via de sinalização do carcinoma hepatocelular e os miRNAs envolvidos em todas as fases da formação deste câncer. O miRNA é uma pequena moléculas não codificadoras de RNA com aproximadamente 21-23

nucleotídeos de comprimento, capazes de regular a expressão gênica através da degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvo de RNA mensageiro (AMARAL et al., 2010).

A diminuição na expressão de miRNAs tem sido amplamente observada em diferentes estágios do câncer resultando no aumento da expressão oncogênica, ao contrário da superexpressão de miRNAs específicos que pode levar à repressão de genes supressores de tumor. Em ambas as situações os efeitos malignos subsequentes são induzidos na proliferação celular, diferenciação e apoptose que levam ao crescimento e desenvolvimento do tumor (KEGG, 2020c).

No contexto do colangiocarcinoma, poucos estudos investigaram o perfil de circulação de miRNA em pacientes oncológicos, porém duas meta-análises têm sugerido seu potencial no diagnóstico (LIANG et al., 2016; ZHOU; LIU; YANG, 2017). Apesar de terem sido levantados miRNA diferencialmente circulantes, comparando indivíduos saudáveis e diagnosticados com colangiocarcinoma, sendo três na bile (miRNA-9, -145 e -150-5p), dois na urina (miRNA-21 e -192) e oito no plasma (miRNA-21, -192, -106a, -150-5p, -150, -222, -483-5p e -194), o miRNA-21 é um dos mais bem caracterizados em termos de seu potencial como biomarcador no diagnóstico de colangiocarcinoma (MACIAS et al., 2019).

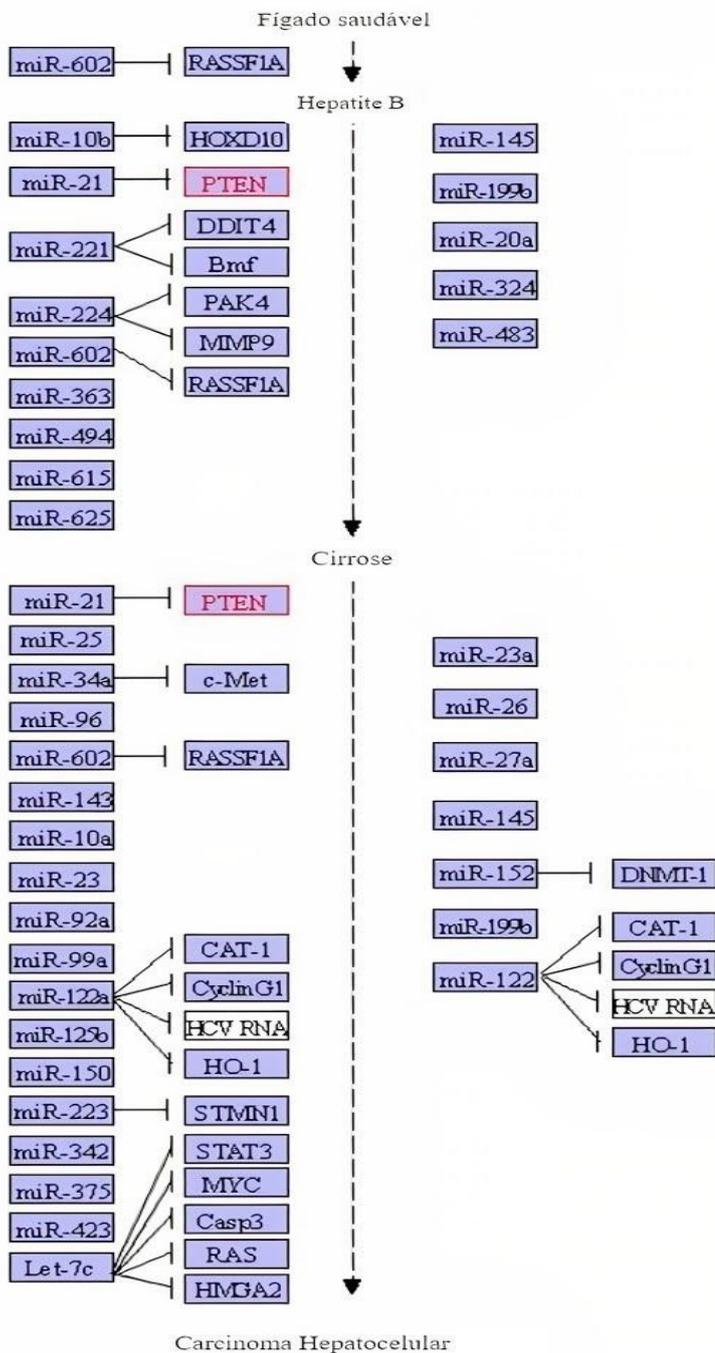
No caso do *PTEN*, seus níveis são regulados em células cancerígenas por vários RNAs endógenos competidores, os quais influenciam a disponibilidade de miRNAs que possuem como alvo a expressão de *PTEN* (TAY et al., 2011). Neste caso, o miRNA-21 não só desempenha papel importante (figura 10) criando um ambiente pró-tumorigênico ao direcionar vários genes supressores de tumor (PAN; WANG; WANG, 2010), mas também diminuindo a proliferação e migração celular, e invasão e crescimento tumoral (MENG et al., 2007) em colangiocarcinoma intra-hepático (figura 10), além de se revelar um marcador de diagnóstico e prognóstico e um potencial alvo terapêutico para esse tipo de câncer hepatocelular (WANG et al., 2015; CORREA-GALLEGO et al., 2016).

MicroRNAs NO CÂNCER

Carcinoma Hepatocelular

Micro RNAs ativados

Micro RNAs inativados



05206 7/24/19
 (c) Kanehisa Laboratories

Figura 10 - Via de sinalização de miRNAs no carcinoma hepatocelular.

Fonte: Adaptada de KEGG (2020c).

CONCLUSÃO

A partir dos dados levantados utilizando ferramentas de bioinformática e revisão da literatura foi possível descrever a estrutura e função do gene e da proteína PTEN no organismo humano e sua relevância nos estudos relacionados ao câncer.

Localizado no braço longo do cromossomo 10, o gene *PTEN* possui 1.212 nucleotídeos e apresenta como principais funções a supressão tumoral e a motilidade celular. Já a proteína PTEN, pertencente à família tirosina fosfatase, apresenta 403 resíduos de aminoácidos e pode ser localizada no núcleo, no citoplasma e também na região extracelular. Ademais, apesar de não haver um consenso sobre a estrutura dos seus domínios, os estudos revelam que existam os domínios C2, PEST, PDZ, de ligação a PIP2 e o fosfatase.

O gene *PTEN* é altamente expresso no organismo humano em diversos tecidos, entre eles o fígado, onde o carcinoma hepatocelular é o câncer primário e a sinalização pela PI3K/AKT é uma das principais vias, sendo influenciada diretamente por *PTEN*.

Algumas mutações do tipo *missense* no *PTEN* também foram associadas aos carcinomas, podendo resultar numa grave perda de funcionalidade na região catalítica da proteína. Além disso, o miRNA21 foi revelado como um potencial biomarcador no colangiocarcinoma, estando relacionado com o *PTEN*.

Entender as inúmeras possibilidades de regulação da atividade de PTEN ainda é um tema pertinente para estudo, uma vez que por meio desse mecanismo podemos entender como modular a sua atividade em prol terapêutico, de diagnóstico e prognóstico eficientes do câncer.

REFERÊNCIAS

- ALI, I. U.; SCHRIM, L. M.; DEAN, M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 22, 1922-1932, 1999. DOI: 10.1093/jnci/91.22.1922
- AMARAL, B. A. MicroRNAs – Biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. **Odontologia Clínico-Científica**, v. 9 n.2 p. 105-109, 2010. Disponível em: <http://revodonto.bvsalud.org/pdf/occ/v9n2/a03v9n2.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000. DOI: 10.1093/nar/28.1.235
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492
- CANCER GENETICS WEB. PTEN. Disponível em: <http://www.cancerindex.org/geneweb/PTEN.htm>. Acesso em: 10 jul. 2020.
- CARMO, A. F. **Expressão imunoistoquímica de EGFR e PTEN em displasias epiteliais orais**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/17130>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- CHEN, G. et al. Clonal evolution in long-term follow-up patients with hepatocellular carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 143, n.11, p. 2862–2870, 2018. DOI: 10.1002/ijc.31844
- CHEN, G. et al. Genomic and transcriptomic landscape of tumor clonal evolution in cholangiocarcinoma. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 1-11, 2020. DOI: 10.3389/fgene.2020.00195

- CHROMOSOME DISORDER OUTREACH. **Looking for the hidden mutation: Bannayan–Riley–Ruvalcaba Syndrome 10Q23 microdeletions.** 08 jul. 2020. Disponível em: <https://chromodisorder.org/latest-research-articles/looking-for-the-hidden-mutation-bannayan-riley-ruvalcaba-syndrome-10q23-microdeletions/>. Acesso em: 17 nov. 2020.
- CONNELL, L. C. et al. Combined intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. **Chinese Clinical Oncology**, v. 5, n. 5, p. 1-9, 2016. DOI: 10.21037/cco.2016.10.02
- CORREA-GALLEGO, C. et al. Circulating plasma levels of microRNA-21 and microRNA-221 are potential diagnostic markers for primary intrahepatic cholangiocarcinoma. **Plos One Journal**, v 11, n. 9, p. 1-16, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0163699
- COSMIC. CATALOGUE OF SOMATIC MUTATIONS IN CANCER. **Cholangiocarcinoma.** 2020a. Disponível em: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- COSMIC. CATALOGUE OF SOMATIC MUTATIONS IN CANCER. **PTEN.** 2020b. Disponível em: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic3d/protein/PTEN?pdb=5BZZ>. Acesso em: 26 nov. 2020.
- COSTA, J. R. **Análise da expressão da proteína PTEN em carcinoma papilar de tireoide.** 2012. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Molecular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-AQ3PQK/1/mestrado_final_2017.pdf. Acesso em: 27 nov. 2020.
- CUSTÓDIO, A. C. **Avaliação molecular do gene supressor de tumor PTEN em tumores do sistema nervoso.** 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17135/tde-11062013-150806/publico/MestradoAlineCadurinCustodio.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2020.

- DIRICAN, E.; AKKIPRIK, M. Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 and phosphatase and tensin homolog as therapeutic targets in breast cancer. **Tumor Biology**, v. 39, n. 3, p. 1-16, 2017. DOI: 10.1177/1010428317695529
- DRUGBANK. **Tartaric acid**. Disponível em: <https://go.drugbank.com/drugs/DB09459>. Acesso em: 27 nov. 2020
- EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2557-2576, 2007. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.04.061
- FAGERBERG, L. et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 2, p. 397-406, 2014. DOI: 10.1074/mcp.M113.035600
- GASTEIGER, E. et al. **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server**. In: WALKER, J. M. (ed) The Proteomics Protocols Handbook, Totowa: Humana Press, p. 571-607, 2005.
- GENOMENET. **Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN (hsa:5728 K01110)**. 2020. Disponível em: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?-f+-n+n+hsa:5728. Acesso em: 03 dez. 2020.
- GIL, A. et al. Nuclear localization of PTEN by a ran-dependent mechanism enhances apoptosis: involvement of an N-terminal nuclear localization domain and multiple nuclear exclusion motifs. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 9, p. 4002-4013, 2006. DOI: 10.1091/mbc.e06-05-0380
- HOPKINS, B. D. et al. A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. **Science**, v. 341, n. 6144, p. 399-402, 2013. DOI: 10.1126/science.1234907

- HOWITT, J. et al. Ndfip1 represses cell proliferation by controlling Pten localization and signaling specificity. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 119–131, 2015. DOI: 10.1093/jmcb/mjv020
- INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é câncer?**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 10 jul. 2020. 03/04/2019
- JOTTA, P. Y. **Mutações de PTEN nas leucemias linfóides agudas T**. 2012. 72 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética Animal e Evolução) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/316892> . Acesso em: 01 dez. 2020
- KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000. DOI: 10.1093/nar/28.1.27
- KEGG. KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. **Hepatocellular carcinoma**. 2020a. Disponível em: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa05225+N00052. Acesso em: 27 nov. 2020
- KEGG. KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. **MicroRNAs in câncer**. 2020c. Disponível em: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map05206. Acesso em 27 nov 2020
- KEGG. KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. **PI3K-Akt signaling pathway**. 2020b. Disponível em: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04151+5728. Acesso em 27 nov. 2020
- KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 1, p. D230–D234, 2004. DOI: 10.1093/nar/gkh008
- LAZARIDIS, K. N.; GORES, G. J. Cholangiocarcinoma. **Gastroenterology**, v. 128, n. 6, p. 1655-1667, 2005. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.03.040

- LEE, C. et al. Viral hepatitis-associated intrahepatic cholangiocarcinoma shares common disease processes with hepatocellular carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 11, p. 1765-1770, 2009. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605063
- LEE, J. O. et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor. **Cell Press**, v. 99, n. 3, p. 323-334, 1999. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81663-3
- LENZ, A. R. **Anotação genômica**. In: SILVA E AVILA, S; NOTARI, D. L.; DALL'ALBA, G. *Bioinformática: contexto computacional e aplicações*. Caxias do Sul: Educs, 2020. p. 259-284. Disponível em: <https://www.ucs.br/educs/arquivo/ebook/bioinformatica-contexto-computacional-e-aplicacoes/>. Acesso em: 03 dez. 2020.
- LI, D. M.; SUN, H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. **Journal of Cancer Research**, v. 57, n. 11, p. 2124-2129, 1997. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/57/11/2124>. Acesso em: 28 nov. 2020
- LI, J. et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science**, v. 275, n. 5308, p. 1943-1947, 1997. DOI: 10.1126/science.275.5308.1943
- LI, L.; ROSS, A. H. Why is PTEN an important tumor suppressor? **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, n. 6, p. 1368-1374, 2007. DOI: 10.1002/jcb.21593
- LIANG, H. et al. PTEN α , a PTEN isoform translated through alternative initiation, regulates mitochondrial function and energy metabolism. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 5, p. 836-848, 2014. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.03.023
- LIANG, Z. et al. Diagnostic value of microRNAs as biomarkers for cholangiocarcinoma. **Digestive and Liver Disease**, v. 48, n. 10, p. 1227-1232, 2016. DOI: 10.1016/j.dld.2016.07.006

- LINDSAY, Y. et al. Localization of agonist-sensitive PtdIns(3,4,5)P3 reveals a nuclear pool that is insensitive to PTEN expression. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 24, p. 5160-5168, 2006. DOI: 10.1242/jcs.000133
- LUCCHESI, A. M. et al. **Colangiocarcinoma**. In: SANTOS, M et al. Diretrizes Oncológicas 2, p. 219-225, 2018. Disponível em: https://diretrizesoncológicas.com.br/wp-content/uploads/2018/10/Diretrizes-oncol%C3%B3gicas-2_Parte15.pdf. Acesso em: 27 ago. 2020.
- MACIAS, R. I. R. et al. Diagnostic and prognostic biomarkers in cholangiocarcinoma. **Liver International**, v. 39, n. S1, p. 108-122, 2019. DOI: 10.1111/liv.14090
- MARQUES, C. M. C. **Como diferenciar colangiocarcinoma de doenças benignas do trato biliar?** Portal PEBMED, 21 jan. 2019. Oncologia. Disponível em: <https://pebmed.com.br/como-diferenciar-colangiocarcinoma-de-doencas-benignas-do-trato-biliar/>. Acesso em: 7 jul. 2020.
- MEHENNI, H. et al. LKB1 interacts with and phosphorylates PTEN: a functional link between two proteins involved in cancer predisposing syndromes. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 15, p. 2209–2219, 2005. DOI: 10.1093/hmg/ddi225
- MENG, F. et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p. 647-658, 2007. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.05.022
- MURAKAMI, Y. et al. Comprehensive analysis of transcriptome and metabolome analysis in intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-12, 2015. DOI:10.1038/srep16294
- NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 34-35, 1999. DOI: 10.1016/s0968-0004(98)01336-x

- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Genetics Home Reference**. Desenvolvido pelo U.S. National Library Medicine. 2020. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 27 ago. 2020.
- NCBI. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Gene PTEN**. 2020a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5728>. Acesso em: 29 nov. 2020.
- NCBI. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Proteína PTEN**. 2020b. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAD38372.1?report=fasta>. Acesso em: 29 nov. 2020.
- PAN, X.; WANG, Z.; WANG, R. MicroRNA-21: A novel therapeutic target in human cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 10, n. 12, p. 1224-1232, 2010. DOI: 10.4161/cbt.10.12.14252
- PROTEIN DATA BANK. **PTEN**. 2020. Disponível em: <https://www.rcsb.org/3d-view/1D5R/1>. Acesso em: 29 nov. 2020.
- PROTPARAM. **Sequência de aminoácidos da PTEN**. 2020. Disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>. Acesso em: 30 nov. 2020.
- SCORSATO, V. **Regulação de proteínas fosfatases envolvidas em câncer: estudos estruturais da TIPRL e interação com a Proteína Fosfatase 2A**. 2015. 163 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal e Evolução) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/317261>. Acesso em: 16 nov. 2020.
- SEKIYA, S.; SUZUKI, A. Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 11, p. 3914-3918, 2012. DOI: 10.1172/JCI63065.

- SHAIB, Y. H. et al. Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study. **Gastroenterology**, v. 128, n. 3, p. 620–626, 2005. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.12.048
- SHARRAD, R. M.; MAITLAND, N. J. Alternative splicing of the human PTEN/MMAC1/TEP1 gene. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1494, n. 3, p. 282-285, 2000. DOI: 10.1016/S0167-4781(00)00210-4
- SHEN, W. H. et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. **Cell**, v. 128, n. 1, p. 157-170, 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.042
- SONG, M. S. et al. The deubiquitinylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP–PML network. **Nature**, v. 455, p. 813–817, 2008. DOI: 10.1038/nature07290
- SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nature Reviews-Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 283-296, 2012. DOI: 10.1038/nrm3330
- SOUZA, W. F. D. et al. Sinalização celular em câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 30-33, 2014. DOI: 10.21800/S0009-67252014000100013
- STECK, P. A. et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nature Genetics**, v. 15, n. 4, p. 356-362, 1997. DOI: 10.1038/ng0497-356
- SWISS-MODEL. **P60484** - **PTEN** **human**. Disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P60484?template=1d5r>. Acesso em: 30 nov. 2020.
- TATE, J. G. et al. COSMIC: The catalogue of somatic mutations in cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D941–D947, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1015

- TAY, Y. et al. Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 344-357, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.029
- THE HUMAN PROTEIN ATLAS. **PTEN**. 2020. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000171862-PTEN/summary/rna>. Acesso em: 30 nov. 2020.
- THEMSCHE V. C. et al. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20462-20466, 2009. DOI: 10.1074/jbc.C109.009522
- TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases: from housekeeping enzymes to master-regulators of signal transduction. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 2, p. 346-378, 2013. DOI: 10.1111/febs.12077
- UHLÉN, M. et al. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, v. 347, n. 6220, p. 1260419-1-1260419-9. DOI: 10.1126/science.1260419
- WAITE, K. A.; ENG, C. Protean PTEN: Form and Function. **American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 4, p. 829-844, 2002. DOI: 10.1086/340026
- WANG, L. J. et al. MiR-21 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma proliferation and growth in vitro and in vivo by targeting PTPN14 and PTEN. **Oncotarget**, v. 6, n. 8, p. 5932-5946, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.3465
- WARDELL, C. P. et al. Genomic characterization of biliary tract cancers identifies driver genes and predisposing mutations. **Journal of Hepatology**, v. 68, n.5, p. 959-969, 2018. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.009
- WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. W296–W303, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky427

- WELZEL, T. M. et al. Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma in a low-risk population: A nationwide case-control study. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 3, p. 638-641, 2007. DOI: 10.1002/ijc.22283
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Brazil, Cancer Country Profile 2020**. 2020d. Disponível em: https://www.who.int/cancer/country-profiles/BRA_2020.pdf?ua=1. Acesso em: 12 jul. 2020.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2020a. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1. Acesso em: 8 jul. 2020.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Cancer Observatory (GCO)**. 2020b. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 8 jul. 2020.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global, WHO Cancer Regional Profile 2020**. 2020c. Disponível em: https://www.who.int/cancer/country-profiles/Global_Cancer_Profile_2020.pdf. Acesso em: 12 jul. 2020.
- XUE, R. et al. Genomic and transcriptomic profiling of combined hepatocellular and intrahepatic cholangiocarcinoma reveals distinct molecular subtypes. **Cancer Cell**, v. 35, n. 6, p. 932-947, 2019. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.04.007
- YU, C. S. et al. Prediction of protein subcellular localization. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 64, n. 3, p. 643-651, 2006. DOI: 10.1002/prot.21018
- YU, C. S.; LIN, C. J.; HWANG, J. K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. **Protein Science**, v. 13, n. 5, p. 1402-1406, 2004. DOI: 10.1110/ps.03479604
- ZHOU, J. et al. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 41, n. 2, p. 156-162, 2017. DOI: 10.1016/j.clinre.2016.10.007