



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR

VALDENIRA DE JESUS OLIVEIRA KATO

**IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA PTEN EM AMOSTRAS DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE BUCAL E SUA CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS
CLÍNICO-PATOLÓGICAS E SOBREVIVÊNCIA**

Belém

2016

VALDENIRA DE JESUS OLIVEIRA KATO

**IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA PTEN EM AMOSTRAS DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE BUCAL E SUA CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS
CLÍNICO-PATOLÓGICAS E SOBREVIVÊNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Pará como exigência para obtenção do título de mestre em Neurociências e Biologia Celular, do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano

Coorientador: Prof. Dr. Hélder Antônio Rebelo Pontes

Belém

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) –

Kato, Valdenira de Jesus Oliveira.

Imunoexpressão da proteína PTEN em amostras de carcinoma epidermoide bucal e sua correlação com características clínico-patológicas e sobrevida. / Valdenira de Jesus Oliveira Kato. - 2016
60 f., il; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

Orientador: Rommel Mário Rodriguez Burbano

Coorientador: Hélder Antônio Rebelo Pontes

1. Câncer - Diagnóstico. 2. Boca - Doença. I. Rodriguez Burbano, Rommel Mário, *orient.* II. Pontes, Hélder Antônio Rebelo, *oth.* III. Título.

CDD: 23. ed.616.994

Bibliotecária Esp. Elisangela Silva da Costa, CRB-2 n. 983



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR

VALDENIRA DE JESUS OLIVEIRA KATO

**IMUNOEXPRESSION DA PROTEÍNA PTEN EM AMOSTRAS DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE BUCAL E SUA CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS
CLÍNICO-PATOLÓGICAS E SOBREVIDA**

Julgada e aprovada em Belém,/...../.....

BANCA EXAMINADORA:

Profº. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA (Orientador)

Profº.Dr. Hélder Antônio Rebelo Pontes
Hospital Universitário João de Barros Barreto. Laboratório de Patologia Bucal
(Co-Orientador)

Profº. Dr. Nicolau Comte Neto
Centro de Ensino Superior do Pará – CESUPA

Profº. Dra. Tatiane Mota
Escola Superior da Amazônia – ESAMAZ

Dra. Letícia Martins Lamarão
Fundação Hemopa – HEMOPA (Suplente)

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

INSTITUIÇÕES

Universidade Federal do Pará (UFPA) – Laboratório de Citogenética Humana e Toxicológica, Instituto de Ciências Biológicas.

Hospital Universitário João de Barros Barreto – Laboratório de Patologia Bucal

FONTES FINANCIADORAS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ

- Bolsa de Mestrado

Dedico este trabalho ao meu esposo **Alberto Kato** e meus filhos **Felipe e Daniel**, meus anjos de luz.

Aos meus **pais, irmãs e sobrinhas** pela
companhia constante e por sempre
estarem ao meu lado em todos os
momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua infinita misericórdia, pelo dom da vida e por me abençoar a cada dia.

Em especial ao meu Orientador Prof^o. Dr. **Rommel Burbano**, ser sua aluna, foi para mim uma honra e um presente. Quero deixar registrado aqui minha eterna gratidão e lhe dizer que jamais convivi com uma pessoa tão humana quanto você!

Agradeço pela sua amizade, pelo exemplo de pessoa ética e íntegra e por sempre querer o melhor para seus alunos. Sua missão vai muito além da missão de um professor, você é um verdadeiro mestre!

Você sempre será um exemplo de pesquisador para mim e por isso nestas sinceras palavras lhe agradeço pela oportunidade, apoio e pelo exemplo de conduta e profissionalismo repassado por você durante minha formação científica. Minha eterna gratidão!

Ao meu co-orientador Prof^o. Dr. Hélder Antonio Rebelo Pontes, pelo apoio constante na minha formação profissional, pela seriedade com que conduz suas atividades científicas e por sua grandiosa amizade. Minha eterna gratidão.

À Prof^a Dr^a Flávia Sirotheau Correa Pontes pela disponibilidade e paciência com que ajudou na construção deste trabalho e sua valiosa amizade. Muito obrigada por tudo!

Em especial à minha amiga Prof^a Dra. Carolina Heitmann M. Azevedo pela amizade e grandiosa ajuda científica no decorrer da formação deste estudo e pelo apoio constante em todos os momentos solicitados. Meu eterno agradecimento.

À Dra Letícia Lamarão, Prof^a Dr^a Edna Cristina Franco, Prof^a Dra. Tatiane Motta agradeço pela sua amizade e apoio durante a realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo!

Aos meus grandes amigos Dr. Douglas Magno Guimarães e Dra. Michelle Carvalho de Abreu pela amizade grandiosa e pela disponibilidade em ajudar-me nas horas em que mais precisei na construção deste trabalho. Muito obrigada por tudo!

Aos também amigos João Mateus Mendes Cerqueira, Antonio Adolfo Pimentel Albuquerque, Ana Carolina Alves, Jaciane do Carmo Ribeiro, meus sinceros agradecimentos pela amizade e apoio na realização deste trabalho.

À Lygia Akiko Ninokata Miyahara, Verena Karla Monteiro Lopes, Girlene Maria do Rego Bezerra, Victor Feliz Pedrinha pelo auxílio e disposição em ajudar-me na parte técnica deste trabalho meu eterno agradecimento.

Agradeço a Deus por ter conhecido pessoas tão maravilhosas como vocês!

À toda equipe do Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará, Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Biologia Celular e do Laboratório de Patologia Bucal do Hospital Universitário João de Barros Barreto foi maravilhoso conviver com toda essa equipe!

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”.

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O Carcinoma de Células Escamosa Oral (CCEO) é a neoplasia maligna mais comum que afeta a cavidade oral, sendo responsável por mais de 90% dos casos diagnosticados neste sítio anatômico. Apesar dos recentes avanços no tratamento, a taxa de sobrevivência de 5 anos ainda gira em torno de 30-50%. Mecanismos moleculares que esclarecem a agressividade de lesões ajudam na identificação de quimioterápicos que possam ser utilizados para melhorar a taxa de sobrevida. O objetivo deste estudo foi investigar a imunexpressão da proteína PTEN através da técnica de imuno-histoquímica (IHC) em amostras de pacientes com carcinoma epidermoide de boca (CEB) e relacioná-la com características clínico-patológicas, grau histológico e sobrevida e, ao lado disso, avaliar a presença de deleção alélica através da técnica de FISH. Nossos resultados mostraram que em um total de 119 casos de carcinoma epidermoide, 31 casos foram negativos para expressão de PTEN e 88 casos foram positivos, sendo 15 (17,05%) bem diferenciados, 43 (48,86%) moderadamente diferenciados e 30 (34,09%) pouco diferenciados. Considerando as características clínico-patológicas não foram encontradas correlações estatísticas significantes com a expressão de PTEN por IHC. Em relação à sobrevida foi observado que pacientes com infiltração linfonodal (N) = 2 ou 3 cm tem risco 4 vezes maior de ir a óbito do que um paciente com N = 0 ou 1 cm. Por fim, houve associação significativa entre expressão por IHC negativa e o resultado da técnica de FISH no que diz respeito a deleção e entre expressão por IHC positiva e o resultado da técnica de FISH não deletado.

Palavras-chave: PTEN. Carcinoma epidermoide bucal. Sobrevivência.

ABSTRACT

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is the most common malignant neoplastic that affects the oral cavity, accounting for 90% of all cases diagnosed in this anatomic site. Despite the recent advances in the treatment, the survival rate varies from 30 to 50%. Molecular mechanisms which elucidates the aggressive behaviour of these lesions help to identify new chemotherapeutics that might be used in the treatment in order to improve the survival rates. The aim of this study was investigating the immunoeexpression of PTEN protein through the immunohistochemical technique (IHC) in CEB samples and relate them with clinicopathological features, histological grades and survival and in addition, evaluate the presence of allelic deletion through the Fluorescent *In Situ* Hybridization technique (FISH). Our results showed that a total from 119 cases of CEB, 31 cases were negative to expression of protein PTEN and 88 cases were positive for PTEN, from which 15 (17,05%) were well differentiated, 43 (48,86%) moderately differentiated and 30 (34,09%) were poorly differentiated. Considering the clinicopathological features, there were not statistically significant correlations with the IHC expression of PTEN. Regarding the survival rates, it was observed that patients presenting lymph node infiltration (N) = 2 or 3 has 4 times greater risk of dying than those presenting N = 0 or 1. Finally, there was a significant association between expression by IHC negative and the result of FISH technique regarding the deletion, and between the positive PTEN expression and the non-deleted result of FISH technique.

Keywords: PTEN. Oral Squamous Cell Carcinoma. Survival.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Representação do gene PTEN	22
Figura 2-Representação da via de sinalização PI3K/AKT	23
Figura 3-Relação entre PTEN e p53 em células neoplásicas. (a) Demonstra a fosforilação de Mdm2 no citoplasma por AKT, que induz a ligação com p53 no núcleo. (b) Ação inibitória de PTEN sobre PI3K	27
Figura 4-Representação do padrão de expressão de PTEN.....	40
Figura 5-Curva de sobrevida dos casos de CEB com a expressão de PTEN	44
Figura 6-Curva de Kaplan-Meier em relação ao sexo, tabagismo, localização, tamanho do tumor, envolvimento linfonodal e estadiamento.	46
Figura 7-Análise de FISH nas amostras de CEB e a correlação com a imunohistoquímica	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição e intensidade das células por imunomarcacão.....	37
Tabela 2- Correlacão entre proteína PTEN e fatores clínico-patológicos.....	42
Tabela 3- Relacão da expressão da proteína PTEN quanto ao grau histológico....	43
Tabela 4- Razão de risco para que as variáveis estudadas levem ao óbito.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American joint committee on cancer
AKT	Alpha serine threonine protein kinase
BCI2	B cell lymphoma 2
CEB	Carcinoma epidermoide bucal
CECP	Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico
FISH	Hibridização <i>In situ</i> fluorescente
GST	Glutathione S transferase
GTP	Proteína trimérica ligada a proteína G
HDAC	Enzima histona desacetilase
HGFR	Receptor de fator de crescimento de hepatócitos
HRAS	Isoforma H da proteína Ras
IGF-1	Receptor de fator-1 de crescimento insulina
IHC	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDM2	Murine double minute 2
MMAC1	Mutated in multiple advanced cancers 1
mTOR	Mammalian targeted of rapamycin
MVP	Major vault de protein
NAB	N nitrosoanabasine
NAT	N nitrosoanatabina
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear κ B
NNK	4 metil N nitrosamina
NNN	N nitrosornicotina
NSLCC	Células não pequenas de câncer de pulmão
OSCC	Carcinoma de células escamosas oral
P300/CBP	Proteína acetiltransferase
PDGFR	Receptor de fator de crescimento de fibroblastos
PDGFR	Receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta

PDK	Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase
PH	Pleckstrin homolog
PI3K	Fosfatidil inositol 3 kinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4-5 bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato
PTEN	Phosphatase and tensin homologue
PTP	Proteína tirosino fosfatases
RAS	Rat sarcoma vírus
RTKs	Receptores tirosina kinases
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TEP	Regulated and epithelial cell enriched phosphatase
TGF- α	Fator de crescimento de transformação α
TGF- β	Fator de crescimento de transformação β
TGF β R 1	Receptor de fator de crescimento TGF β tipo 1
TNM	Tumor nódulo metástase
TSA	Droga trichostatin A
UICC	Union for International Cancer Control

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Carcinoma Epidermoide Bucal	19
2.2 Gene <i>PTEN</i>	21
2.2.1 <i>PTEN</i> em Neoplasias	27
3 OBJETIVOS	34
3.1 Geral.....	34
3.2 Específicos	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Seleção das amostras	35
4.2 Análise Imuno-histoquímica.....	36
4.2.1 Análise da imunomarcacão	37
4.3 Hibridização <i>in situ Fluorescente</i>	38
4.3.1 Pré-Tratamento das lâminas	38
4.3.2 Desnaturacão e Hibridacão	38
4.3.3 Revelacão e Contra-Coloracão	38
4.4 Análise estatística.....	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Expressão da proteína <i>PTEN</i> em carcinoma epidermoide	40
5.2 Correlacão da expressão de <i>PTEN</i> com o grau histológico	42
5.3 Análise da expressão da proteína <i>PTEN</i> com a sobrevida.....	43
5.4 Análise da sobrevida em função de variáveis clínicas.....	44
5.5 Resultado da Hibridizacão <i>In Situ Fluorescente</i>	47
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide é a neoplasia maligna mais comum que afeta a boca sendo responsável por mais de 90% dos casos diagnosticados neste sítio anatômico. Apesar dos avanços no campo da quimio e radioterapia e das técnicas cirúrgicas, a sobrevida dos pacientes com carcinoma epidermoide de boca (CEB), avaliada em cinco anos, não tem melhorado nas últimas décadas, variando em torno de 30 a 50% em várias partes do mundo (GALBIATTI et al., 2013; PATHARE et al., 2011).

A avaliação do prognóstico e as decisões sobre estratégias de tratamento do CEB são baseadas no sistema tumor nódulo metástase (TNM) proposto por Union for International Cancer Control (UICC) (GOSPODAROWICZ; WITTEKIND; SOBIN, 2009) e pela American Joint Committee on Cancer (AJCC). (GREENE; PAGE; MORROW, 2002).

Em virtude de tais fatores clínicos possuírem limitado valor prognóstico para o CEB é importante identificar novos marcadores moleculares que auxiliem na avaliação da agressividade da doença para fornecer melhor caracterização terapêutica para os pacientes e em última análise validar a ação de quimioterápicos, o que seria importante para a diminuição da morbidade provocada pelas cirurgias mutiladoras (VORA et al., 2003; KUDO et al., 2004; HAGEN; SIMON JUNIOR, 2007; LINDENBLATT et al., 2012).

Em 1997, Jing Li et al. identificaram um gene supressor de tumor denominado *PTEN* (Phosphatase and Tensin Homologue) que funciona como fosfatase em ampla variedade de neoplasias humanas, tais como: glioma, câncer de mama, próstata, endométrio e pele. O gene *PTEN* está localizado no cromossomo 10q23 e a proteína por ele expressa, é constituída de 403 aminoácidos, sendo seu principal substrato *in vivo*, o fosfatidilinositol 3-4-5 trifosfato (PIP3) o qual está presente na membrana celular (MYERS et al., 1997). A proteína Phosphatase and Tensin homologue (PTEN) atua como supressora de tumor no citoplasma desfosforilando a molécula PIP3, convertendo-a em fosfatidilinositol 4-5 difosfato (PIP2). Desta forma, PTEN mantém níveis baixos de PIP3 e níveis altos de PIP2 e assim antagoniza diretamente a atividade da proteína quinase PI3K, necessária para a ativação de AKT, uma proteína associada à proliferação celular, apoptose, invasão e metástase, em vários estudos de carcinogênese oral (PLANCHON; WAITE; ENG, 2008; PONTES et al., 2014).

No presente estudo, nós avaliamos a imunexpressão da proteína PTEN através da técnica de Imuno-histoquímica em amostras de carcinoma epidermoide de boca diagnosticados no Serviço de Patologia Oral do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), e posteriormente correlacionamos tal expressão com alguns parâmetros clínicos-patológicos (idade, gênero, tabagismo, etilismo, localização, tamanho do tumor, envolvimento linfonodal e estadiamento) e com a sobrevida dos pacientes, ao lado disso foi avaliada através da técnica de Hibridização *In situ* Fluorescente (FISH), a presença de deleção alélica nas amostras e os resultados obtidos foram relacionados com a expressão por Imunoistoquímica e a presença ou ausência de deleção alélica por FISH.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermoide bucal

A prevalência do CEB em diferentes países e regiões é demonstrada por dados epidemiológicos que apontam um número em torno de 95% de todos os tumores malignos diagnosticados na cavidade oral (LO et al., 2003; VIGNESWARAN; WILLIAMS, 2014). O Brasil, como um país que vem sofrendo mudanças em seu perfil demográfico, em consequência de fatores como urbanização, industrialização e avanços na ciência e na tecnologia, também adquire transformações epidemiológicas, já que a exposição aos fatores de risco contemporâneos se torna mais intensa. Por meio de análise e monitoramento, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima-se que o número de novos casos de câncer da cavidade oral, no país, para 2016 são totalizados em 15.490 casos novos o que configura a sétima neoplasia maligna mais comum em homens com 11.140 casos e nona em mulheres com 4.350 casos (INCA, 2016). Em relação ao estado do Pará a estimativa de novos casos de câncer de carcinoma de boca para o ano de 2016 mostra que são esperados 210 casos novos. Destes, 130 casos novos são previstos em homens e 80 em mulheres (INCA, 2016). Dentre estes, o mais comum tipo de neoplasia maligna bucal é o carcinoma epidermoide, o qual é responsável por nove em dez lesões malignas diagnosticadas (LO et al., 2003; VIGNESWARAN; WILLIAMS, 2014).

O hábito de fumar tabaco é o fator predisponente mais importante para o desenvolvimento do CEB. Ao observar aspectos do tabagismo como frequência do hábito, quantidade e tipo de fumo, verificou-se que ex-fumantes que abandonaram o hábito do vício por um período maior que 10 anos, apresentam menor probabilidade de desenvolver a doença, enquanto que fumantes de cigarros com alta concentração de substâncias nocivas, podem ter um aumento de risco em até dez vezes para o carcinoma de língua e de até catorze vezes para outros sítios bucais em comparação com os não fumantes. A probabilidade de desenvolvimento de carcinoma para ambos os locais está ligada diretamente com o aumento do número de cigarros e a duração do hábito de fumar. O risco associado ao consumo de cigarros cresce com o aumento do consumo, em outras palavras, existe um efeito de dose-resposta (FRANCESCHI et al., 1992; MORENO-LÓPEZ et al., 2000; SEBASTIAN et al., 2014).

Dentre as substâncias carcinógenas existentes no tabaco, destaca-se as N-nitrosaminas: N-nitrosornicotina (NNN), 4-metil-N-nitrosamina (NNK), N-nitrosoanatabina (NAT) e N-nitrosoanabasina (NAB), e radicais livres que impedem a ação de enzimas antioxidantes como a glutatona-S-transferase (GST), glutatona-reductase, superóxido dismutase (SOD), catalase, e glutatona peroxidase (SCULLY, 2011). A exposição persistente do trato aerodigestivo superior aos carcinógenos do tabaco, causa alterações genéticas que afetam a mucosa do trato aerodigestivo (boca, nariz, faringe, traquéia, brônquios, pulmões) e persistem por muitos anos, mesmo que o paciente pare de fumar. Há também aumento de tumores em outros sítios, devido à circulação no sangue de cancerígenos absorvidos para outros órgãos como pulmão, esôfago e bexiga. E ainda outras possíveis consequências adversas para a saúde, como a doença pulmonar obstrutiva crônica e doença cardíaca aterosclerótica (WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND; SCULLY, 2005; SCULLY, 2011).

Outro fator importante a ser considerado é o consumo isolado de álcool, o qual apesar de não ser considerado um fator causal do CEB, pode, quando consumido conjuntamente com o tabaco, induzir a liberação de substâncias genotóxicas, tais como, o etanol e o acetaldeído, potencializando dessa forma, o aumento do risco (BLOCHING et al., 2010). A combinação do abuso do álcool e tabaco, por longos períodos, pode aumentar o risco de uma pessoa adquirir o CEB em mais de quinze vezes (NEVILLE et al., 2009).

A maior prevalência do câncer de boca em homens é perceptível mundialmente numa proporção 2:1 (2♂ : 1♀), principalmente devido ao fato destes estarem mais expostos aos fatores de risco citados anteriormente, embora essa patologia em mulheres tenha aumentado em muitas partes do mundo especialmente em função de mudanças comportamentais (JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011; RAO et al., 2013; NASHER et al., 2014). O CEB acomete, geralmente, pacientes a partir da sexta década de vida, sendo que pacientes com menos de 45 anos são considerados jovens. A relação do aumento do CEB com a idade ocorre tanto pelo fato do simples aumento do tempo de exposição do indivíduo ao carcinógeno, quanto pela alteração no equilíbrio metabólico e hormonal do indivíduo que propicia falha na defesa contra os processos de iniciação e promoção do processo neoplásico (VORA et al., 2003).

Já em relação aos locais de acometimento, a língua, seguida do soalho bucal, são os sítios mais comuns de origem do CEB, representado por valores em torno de

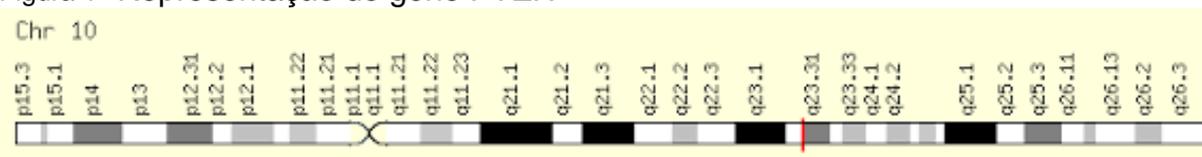
50% das amostras em vários estudos, sendo o principal local, também, nos pacientes que não apresentam o hábito de fumar e naqueles pacientes considerados jovens (VORA et al., 2003).

Quanto à má higiene bucal como fator etiológico para o desenvolvimento do CEB, Bloching et al. 2007, conduziram um estudo clínico prospectivo e verificaram a presença de constituintes genotóxicos da placa dental, como polimicrobiota e estado precário de conservação da dentição dos indivíduos, podem possuir relevante interação mutagênica atuando como co-fator na carcinogênese. Dentre estes aspectos, destaca-se o índice de placa, número de dentes extraídos e não reabilitação protética, assim como, fatores relacionados à atividade genotóxica de elementos encontrados na saliva. Notou-se que a higienização regular da cavidade oral possui significativa ação de limpeza e remoção de elementos prejudiciais à saúde oral, reduzindo a ação de toxinas microbiológicas e metabólitos. A má higiene bucal, por sua vez, mostrou ser fator de aumento do risco para câncer de cabeça e pescoço. Pacientes com periodontite também foram mais propensos a ter carcinoma epidermoide bucal pouco diferenciado, do que aqueles pacientes com boa higiene periodontal (TEZAL et al., 2009). Curiosamente, a prática da má higiene bucal também confere um risco maior para o câncer de esôfago (ABNET et al, 2008).

Finalmente, a escolha do tratamento depende da localização e do tamanho do tumor primário, da idade e saúde geral do paciente, da morbidade associada ao tratamento, da experiência e habilidade do cirurgião e do radiologista oncológico, além dos anseios do paciente (HUSSEINY et al., 2000). Convém ressaltar que a radioterapia é a terapia de eleição para os casos avançados, independente do sítio bucal de acometimento, complementada, quando possível, com a cirurgia, ou mesmo associada à quimioterapia (HADDADIN et al., 2000).

2.2 Gene *PTEN*

Phosphatase and Tensin Homologue Chromosome Ten (*PTEN*), também denominado de Mutated in Multiple Advanced Cancers 1 (MMAC1) e TGF β - regulated and epithelial cell- enriched phosphatase (TEP), é um gene suppressor de tumor de 200 kb que está localizado no cromossomo 10 (10q23), descrito pela primeira vez em 1997 por diferentes pesquisadores (STECK et al., 1997; LI et al., 2012).

Figura 1 -Representação do gene *PTEN*

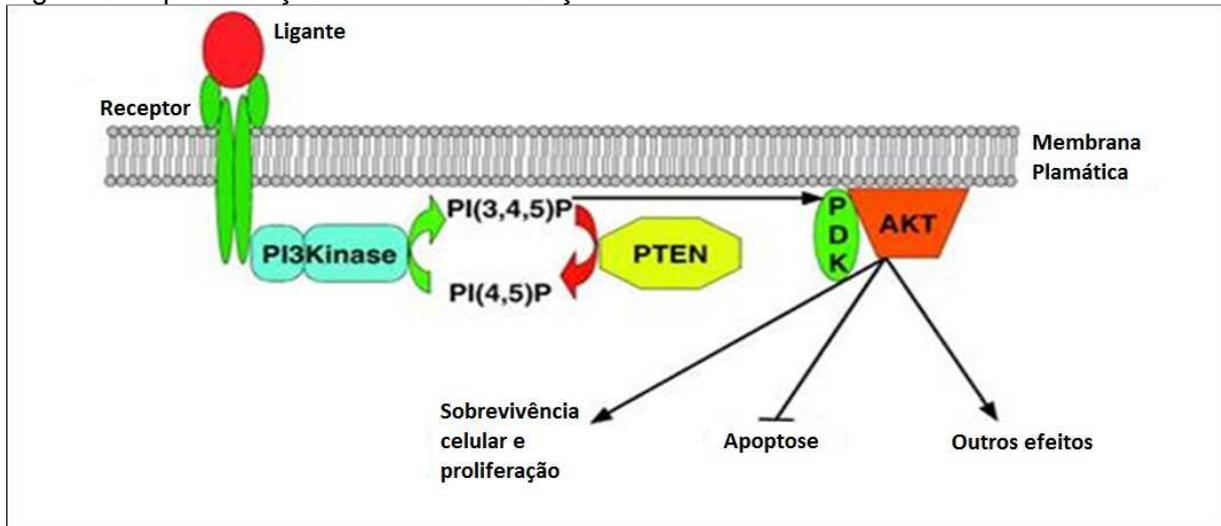
Fonte: GSTATIC, [20--].

O gene *PTEN* codifica a proteína PTEN, formada por 403 aminoácidos, a qual pertence à família das proteínas tirosino-fosfatases (PTP). A estrutura cristalina de PTEN revela uma sequência N-terminal associada ao domínio fosfatase e uma sequência C-terminal, associada ao domínio C2. A cauda C-terminal contém sítios de fosforilação que parecem ser responsáveis por manter a estabilidade da proteína PTEN e possui um sítio de ligação para proteínas que contém o domínio PDZ¹. A fosforilação de PTEN ocorre especialmente nos resíduos de serina 370 e treonina 385 (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006), porém a fosforilação nos sítios formados por resíduos de serina 380 e treonina 382 e 383, aumenta a estabilidade da proteína PTEN (CHOW; BAKER, 2006).

PTEN é classificada como uma enzima interfacial do tipo hopping enzyme, pois solta-se facilmente da membrana e de outras vesículas (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006). Atua como supressor tumoral ao desfosforilar, no citoplasma, o fosfatidilinositol 3-4-5-trifosfato em fosfatidilinositol 4-5 bifosfato. Desta forma, PTEN antagoniza diretamente a atividade da PI3K, provocando diminuição dos níveis de PIP3 e aumento de PIP2, inibindo assim, a atividade de AKT (Protein kinase B), uma proteína kinase serina/threonina, que é a chave em múltiplos processos celulares como metabolismo da glicose, apoptose, proliferação celular, e migração celular (Figura 2). PTEN, ao bloquear a ativação de Akt, atua de forma a inibir a migração, a invasão e a progressão do ciclo celular (PLANCHON; WAITE; ENG, 2008; GIUDICE; SQUARIZE, 2013).

¹ PDZ é uma combinação das primeiras letras de três proteínas PSD95, DlgA e zo-1.

Figura 2-Representação da via de sinalização PI3K/AKT



Fonte: Modificado de PLANCHON; WAITE; ENG, 2008.

Nota: representação da via de sinalização PI3K/AKT/PTEN, onde a ativação do receptor pelo ligante, fosforila PIP2 transformando em PIP3, que irá fosforilar AKT resultando na proliferação celular, apoptose entre outros efeitos.

A PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) pertence a uma família de kinases lipídicas intracelulares que fosforilam o grupo 3'-hidroxil do fosfatidilinositol. A proteína PI3K são divididas em classe I, classe II, classe III de acordo com suas características estruturais, é uma proteína composta de uma subunidade catalítica, denominada p110, e uma subunidade regulatória, denominada p85. Os produtos lipídicos de PI3K atuam como segundos mensageiros, por ligação e ativação de várias moléculas da via de sinalização (GIUDICE; SQUARIZE, 2013).

A ativação de PI3K ocorre através do fator de crescimento, via receptor tirosino-quinase, ou por meio da ativação de RAS (RAc Sarcoma vírus). A ligação da subunidade 85 kDa com o receptor, conduz a subunidade catalítica 110 kDa de PI3K para próximo da membrana, a qual catalisa e fosforila fosfoinosítídeos, produzindo PIP3, a partir de PIP2 (CIDADO; PARK, 2012). A via PI3K está envolvida no controle de funções celulares e propriedades fundamentais, e inclui o crescimento celular, proliferação, diferenciação, sobrevivência, metabolismo, tráfego vesicular, rearranjo do citoesqueleto e motilidade (KATSO et al., 2001; CANTLEY, 2002).

Isoformas de PI3K de classe I são compostos de p110 α (PIK3CA), p110 β (PIK3CB), p110 γ (PIK3CG) e p110 δ (PIK3CD). As PI3Ks de Classe I estão divididas em dois grupos, Classe IA e Classe IB, com base na estrutura e diferenças funcionais. As tirosina quinases receptoras (RTKs), tais como o receptor de factor de crescimento epidérmico (EGFR), receptor do factor de crescimento de hepatócitos (HGFR ou Met),

receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor de factor de crescimento de fibroblastos (FGFR), e receptor do factor-1 de crescimento insulina-like (IGF-1R), atuam como ativadores principais de Classe IA PI3K. A proteína HRAS que é isoforma da proteína RAS também ativa isoformas PI3K Classe I (CHANG et al., 2003). HRAS é frequentemente mutado em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP), especialmente em tumores de pacientes asiáticos e a sua interação com p110 α é mediada pelo domínio RBD em p110 α . A isoforma de PI3K Classe IA (PIK3CA) é um efetor crucial para a gênese tumoral de RAS. A Classe IA de PI3K é a classe mais comum envolvida em cânceres humanos e está localizada no cromossoma 3q26.32 e codifica a subunidade catalítica p110 α de PI3K (GIUDICE; SQUARIZE, 2013).

Alterações genéticas em genes PI3K e aberrações epigenéticas na sinalização PI3K são comumente encontradas no desenvolvimento e progressão do câncer em vários tumores: cólon, cérebro, estômago, mama e pulmão. O PI3KCA é o único gene na família de PI3K com mutações somáticas específicos de tumores (SAMUELS et al., 2004). A via PI3K apresenta com maior frequência mutações em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, em torno de 30,5% dos casos (STRANSKY et al., 2011). Outras vias também podem estar mutadas, além da PI3K, como a via MAPK. Estas mutações concomitantes podem resultar em uma má resposta à quimioterapia (LUI et al. 2013). Tumores com genes da família de PI3K alterados, incluindo *PI3KCA* e *PTEN*, são extremamente sensíveis a inibidores de PI3K/mTOR (do inglês, *mamalian target of rifamycin*), sugerindo que esses inibidores da via podem ser utilizados como um tratamento quimioterápico (JANKU, et al., 2011).

PIP3 é um mediador lipídico que também possui a função de recrutar proteínas que possuem domínio PH (pleckstrin homolog) para a membrana, tais como Akt e PDK (Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase), possibilitando a ativação de AKT por PDK1 para a membrana. PDK1 uma vez na membrana fosforila Akt nos resíduos Treonina 308 e Serina 473, ativando-a (CIDADO; PARK, 2012). A ação fosfatase de PTEN ocorre na posição D3 do fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) e antagoniza a ação da PI3K, funcionando como um regulador negativo por ubiquitinar a via de transdução de sinal na regulação do crescimento, proliferação e sobrevivência celular (CHOW; BAKER, 2006; PLANCHON; WAITE; ENG, 2008).

AKT (alpha serine/threonine-protein kinase) é uma família de genes (*AKT1*, *AKT2* e *AKT3*), expressos na maioria dos tecidos do corpo. Estes genes codificam

AKT1 / PKB- α , AKT2 / PKB- β e AKT3 / PKB- γ , que partilham um elevado grau de similaridade de aminoácidos e são ativados por vias semelhantes em uma maneira dependente da PI3K (HERS; VICENT; TAVARÉ, 2011). Os locais de fosforilação de AKT juntamente com os marcadores de ativação de mTOR, têm valor prognóstico e têm sido implicados na previsão da resposta em quimioterapia para câncer de mama e pulmão (WALLIN et al., 2010). A ativação de AKT ocorre em lesões pré-malignas e em fase tardia carcinomas de cabeça e pescoço, estando relacionada com prognóstico clínico (YU et al., 2007). A superexpressão de AKT1 resulta em lesões orais que são bloqueados por senescência e o silenciamento posterior de p53 permite progressão maligna (MORAL et al., 2009).

A proteína PTEN apresenta tamanho de aproximadamente 47.000 Daltons, entra no núcleo por difusão passiva e pela ligação da proteína PTEN com MVP (Major Vault Protein) (PLANCHON; WAITE; ENG, 2008). A função celular de MVP não é completamente conhecida, porém sua estrutura e localização citoplasmática próxima da membrana nuclear, sugere relação com o transporte celular de moléculas. A localização de PTEN é predominantemente citoplasmática, porém observou-se em culturas de células, a presença de PTEN intranuclear, o que sugere a interação com MVP na mediação da localização intranuclear de PTEN. O exato mecanismo de entrada de PTEN no compartimento nuclear ainda é controverso (YU et al., 2002).

Dentro do núcleo, PTEN mantém a estabilidade cromossômica através da checagem do ciclo celular protegendo as células de danos oxidativos (MING; HE, 2012). A atividade de PTEN no núcleo resulta em regulação negativa por desfosforilação de MAPK (Mitogen-activated protein kinases) e ciclina D1, que induz a parada da multiplicação celular em G0-G1. Este evento produz a diminuição do crescimento tumoral, mostrando a função supressora de tumor de PTEN. O equilíbrio entre o PTEN citoplasmático e o PTEN nuclear é importante para a estabilidade celular, uma vez que o PTEN no citoplasma pode estar relacionada com a inibição da via PI3K/AKT, enquanto a marcação nuclear com o reparo do DNA. Deve-se mencionar também que a diminuição dos níveis de PTEN intranuclear aumenta a atividade das caspases 3/7, mecanismo associado a apoptose (PLANCHON; WAITE; ENG, 2008).

A interação entre PTEN e p53 ocorre por acetilação mediada por uma enzima acetiltransferase chamada p300/CBP, que promove mudança conformacional de p53 formando um tetrâmero, que permite a interação entre PTEN e p53. Essa associação

encontra-se significativamente aumentada após o tratamento com radiação ionizante e radiação ultravioleta. Essa interação é importante para a manutenção da acetilação de p53 em resposta ao dano no DNA (LI et al., 2006).

O *TP53* é um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 17p12, mutado em cerca de metade de todos os CECB (STRANSKY et al., 2011; BRENNAN et al., 1995). Perda funcional de p53 tem sido demonstrado em muitos tumores em humanos e desempenha um papel crítico na transformação maligna (HOLLSTEIN et al., 1991). Alterações de *TP53* estão presentes precocemente nas lesões pré-malignas como displasias da cavidade oral e a prevalência destas mutações, aumenta com a progressão histopatológica da displasia para carcinoma invasivo (BOYLE et al., 1993). Em circunstâncias normais, em resposta a danos no DNA, a p53 se acumula no interior do núcleo e causa a parada do ciclo celular para checagem e reparo do dano, caso o reparo do DNA não seja bem-sucedido, a p53 desencadeia a senescência ou apoptose (HAUPT et al., 2003).

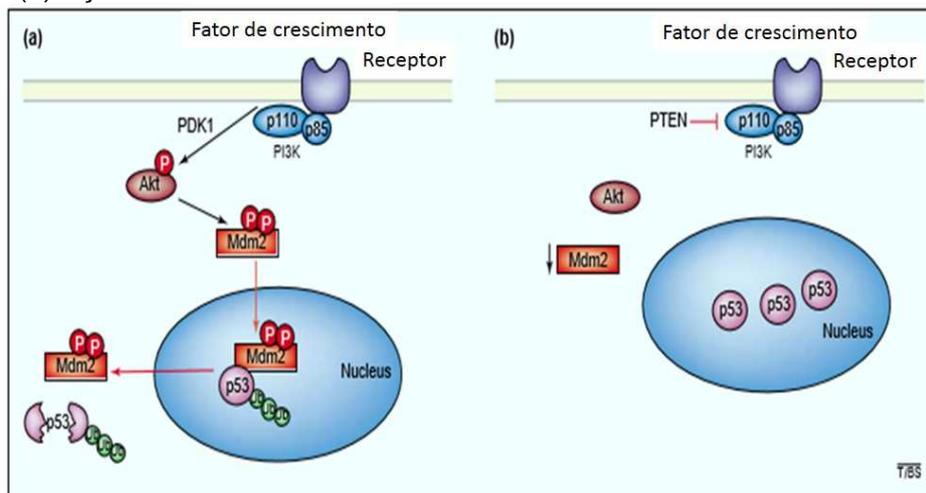
No entanto, as células que albergam mutações em *TP53* não vão sofrer checagem do ciclo celular, apoptose ou senescência. As células deficientes em *TP53* podem replicar na presença de DNA danificado e acumular mutações genéticas adicionais, levando a divisão celular não reparada e formação e progressão do tumor. Mutações no gene *TP53* em CEB, têm sido associados com resposta limitada ao tratamento cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico e morte. Resposta limitada do tumor à radiação ou quimioterapia também tem sido associada com mutações em *TP53*. Arranjos de *TP53* por mutação, deleção, ou outros mecanismos de inativação foram encontrados em 95% dos tumores de carcinoma epidermóide refratários à radiação (GANLY et al., 2000). Os riscos de recorrência loco-regional e morte após uma terapia de radiação primária ou pós-operatório verificou-se ser significativamente maior para pacientes com mutações em *TP53* (SKINNER et al., 2011; TAN; MYERS; AGRAWAL, 2013).

O oncogene *HRAS* também tem sido implicado na gênese do CEB, com incidência variando entre 0% em populações ocidentais e 35% em populações indianas (XU et al., 1998). Estas diferenças na frequência das mutações podem estar relacionadas com o uso de mascar tabaco e betel, embora também possa refletir as variações genéticas entre os grupos étnicos (MURUGAN; MUNIRAJAN; TSUCHIDA, 2012). Proteínas Ras são GTPases que funcionam como interruptores de sinalização, alternando entre o estado ativo ligada a guanosina trifosfato (GTP) e o estado inativo

ligada a guanosinas difosfatos (GDP). A via Ras ativada, em seu percurso, ativa Raf, que por sua vez fosforila MEK, que posteriormente ativa ERK (via Raf / MEK / ERK) envolvido na regulação da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência (CASTELLANO; DOWNWARD, 2010).

PTEN está relacionada, também, ao controle da estabilidade da proteína p53 ao antagonizar a via AKT-MDM2. Quando a proteína AKT está ativada fosforila MDM2 (murine double minute 2), uma ubiquitina-ligase, nos resíduos de aminoácidos Ser166 e Ser186. Essa fosforilação promove a translocação de MDM2 do citoplasma para o núcleo, contribuindo para a degradação da proteína p53. Sendo assim, a proteína AKT age indiretamente na regulação de p53 (OGAWARA et al, 2002; MAYO; DONNER, 2002).

Figura 3-Relação entre PTEN e p53 em células neoplásicas. (a) Demonstra a fosforilação de Mdm2 no citoplasma por AKT, que induz a ligação com p53 no núcleo. (b) Ação inibitória de PTEN sobre PI3K



Fonte: Modificado de MAYO; DONNER, 2002.

Nota: (A) Demonstra a fosforilação de AKT e fosforilação de MDM2 no citoplasma, induzindo a ligação com p53 no núcleo. (B) Ação inibitória de PTEN sobre PI3K, evitando a fosforilação e assim inibindo a degradação de p53 por MDM2.

2.2.1 PTEN em Neoplasias

Mutações somáticas do gene *PTEN* ocorrem em uma grande porcentagem de cânceres humanos, com os números mais elevados sendo encontrados nos cânceres do endométrio (38%), SNC (20%), pele (17%), e próstata (14%). Essas alterações, incluindo mutações, inserções e deleções, ocorrem por todo o gene, embora haja mutações em aminoácidos específicos (Arg130, Arg173 e Arg233). No entanto, essas

mutações não são específicas para um tipo particular de câncer. Supressão alélica completa de *PTEN* também é frequentemente observada em câncer da mama e da próstata, bem como no melanoma e gliomas (SONG; SALMENA; PANDOLFI et al, 2012).

Mecanismos de inativação do gene *PTEN* estão em destaque em cânceres esporádicos. No câncer endometrial, mutações são detectadas em complexas hiperplasias atípicas (lesões pré-malignas na progressão da neoplasia do endométrio), sugerindo um papel na iniciação dos carcinomas endometriais (CHALHOUB; BAKER, 2009). A preservação da função supressora de tumor da proteína PTEN, conforme demonstrado por imunomarcação positiva de PTEN, parece ser um importante e independente indicador de prognóstico de sobrevivência favorável em pacientes com carcinoma endometrial avançado (KANAMORI et al, 2001). Mutações no gene *PTEN* parecem ser pouco frequentes em outras neoplasias ginecológicas (ODILE, 2005). Mutações de *PTEN* foram relatadas em hiperplasias endometriais com e sem atipia citológica, resultando na hipótese de que a perda de função de PTEN predispõe as células do endométrio para a transformação neoplásica (LATTA; CHAPMAN, 2002). Tais mutações têm sido relatadas em 18-55% de lesões pré-malignas do endométrio e em 50-83% dos adenocarcinomas do endométrio (ODILE, 2005).

Em adenocarcinomas gástricos, 10 a 50% dos casos apresentam perda no cromossomo 10q ou 17q, nos quais *PTEN* e *TP53* estão respectivamente localizados (OKI et al., 2005). *PTEN* e *TP53* estão frequentemente mutados em neoplasias humanas, porém a mutação simultânea de ambos não é comum (FREEMAN et al., 2003; KOHN; POMMIER, 2005). A inativação funcional da proteína PTEN em adenocarcinomas gástricos demonstra estar intimamente ligada ao desenvolvimento, progressão e prognóstico da doença. Essa inativação pode ser atribuída a uma mutação do gene, a perda de heterozigidade, hipermetilação do promotor, a regulação da expressão do gene mediada por microRNA e pela fosforilação pós-transcricional. A proteína PTEN também está envolvida em mecanismos que regulam a resistência dos tumores à quimioterapia (XU; YANG; LU et al., 2014). A expressão de PTEN é alta em tecidos gástricos normais e vai reduzindo conforme a progressão dos estágios de malignidade do estômago, até ser pouco expresso em estágios avançados de carcinoma gástrico com doença metastática para linfonodos, indicando

que a expressão de PTEN em carcinoma gástrico pode avaliar o grau de progressão da doença e servir como estadiamento patológico do tumor (BAI et al., 2013).

A perda de *PTEN* desempenha um papel importante na progressão de tumores do sistema nervoso central, desde astrocitomas de grau inferior ao glioblastoma multiforme. Mutações somáticas de *PTEN* são detectadas em mais de 40% dos glioblastomas e a expressão da proteína PTEN é muito baixa ou ausente em dois terços destes tumores (ABOUNADER, 2009). No SNC, perda de 10q, incluindo *PTEN*, é encontrada em cerca de 70% dos glioblastomas e marca a transição para o grau mais agressivo dos tumores astrocíticos. Mutações somáticas no segundo alelo de *PTEN*, o que resulta na inativação bialélica, ocorre em 25% a 40% dos glioblastomas (FURNARI et al., 2007).

O câncer de mama primário ou metastático, também está relacionado à perda de atividade da proteína ou do gene *PTEN*. Um estudo recente investigou o espectro de mutação e de alteração na proteína PTEN em 43 pacientes com lesões mamárias precursoras ou com câncer de mama e 10 indivíduos saudáveis. A análise mutacional nos éxons 1, 5, 7 a 9 do gene *PTEN* revelou várias mutações, a maioria causando o truncamento da proteína PTEN e conseqüentemente perda de atividade. Níveis aumentados da proteína PTEN fosforilada também foram observados por imunohistoquímica em pacientes com câncer de mama e lesões mamárias precursoras, sugerindo uma associação entre o câncer da mama e mutações de *PTEN*, que resulta na produção de formas truncadas da proteína correspondente, indicando assim que a carcinogênese da mama é potencialmente relacionada com a perda de atividade de PTEN em vez de perda de expressão (KECHAGIOGLOU et al., 2014).

O câncer de pulmão é a principal causa mundial de mortalidade relacionada ao câncer. *PTEN* é comumente mutado em vários tipos de câncer de pulmão, como o carcinoma de pulmão de células escamosas, carcinoma de grandes células e o adenocarcinoma. Embora as mutações de inativação de *PTEN* estejam presentes em aproximadamente 10% em células não pequenas de câncer de pulmão (NSLCC, do inglês non small lung cancer cell), a expressão de PTEN é diminuída em tumores de maiores proporções (quase 70%), possivelmente por mecanismos epigenéticos (TANG et al., 2006; LI et al., 2012). Uma frequência elevada de mutações no locus de *PTEN* foi notada em carcinoma de pulmão, porém o papel das alterações observadas

em *PTEN* e sua associação com a gênese do carcinoma de pulmão não são totalmente compreendidos (BOESPFLUG et al., 2013).

Yun et al. (2013), através de um estudo imunohistoquímico mostraram que a perda de expressão de *PTEN*, *EGFR*, *TGF- α* e a superexpressão de *pAKT* estão significativamente correlacionadas com os estágios do carcinoma de NSLCC sugerindo que ambas as atividades podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão destes estágios. Este estudo revelou ainda que a alteração do gene *PTEN* está associada com estágio avançado e metástases linfonodais, sugerindo que *PTEN* pode desempenhar um papel importante na regulação de progressão tumoral e metástases durante o desenvolvimento do NSLCC. Porém, o papel exato do *PTEN* na gênese do NSLCC permanece desconhecido.

A síndrome de Cowden é uma síndrome autossômica dominante ocasionada por mutações na linhagem germinativa de *PTEN*, caracterizada por macrocefalia, lesões gastrointestinais, além de os pacientes desenvolverem múltiplos hamartomas bem como tumores benignos e malignos da tireoide e apresentarem maior risco de câncer de mama e endométrio, tratando-se de pacientes do gênero feminino (CULLY et al., 2006; PRADELLA et al., 2014). As alterações genéticas ou deleções de *PTEN*, além de ocorrer em uma variedade de tumores sólidos, também têm sido descritos frequentemente em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (GAN; ZHANG, 2009; ZHANG, 2010).

2.2.2 *PTEN* em carcinoma epidermoide bucal

A maioria dos pacientes com tumores de boca, expressa moderada quantidade da proteína *PTEN* nos tecidos normais adjacentes ao tumor, enquanto, *PTEN* não está expressa na camada basal de lesões potencialmente malignas. Durante a transformação maligna, o epitélio normal adjacente ao tumor, expressa *PTEN* em maior quantidade, o que sugere expressão aumentada de *PTEN* nessas células como resposta protetora inicial. Entretanto, muitas displasias e carcinomas epidermóides invasivos de cavidade oral, apresentam diminuição da expressão de *PTEN*, especialmente observado nas zonas de invasão epitelial no estroma circundante, indicando que *PTEN* pode ser regulada pela interação das células tumorais com o microambiente celular do paciente. A expressão reduzida de *PTEN* também está

relacionada com a disseminação linfática linfonodal do CEB, pois a expressão diminuída de *PTEN* em pacientes com doença linfonodal metastática avançada, tem sobrevida curta e prognóstico reservado (LEE et al., 2001; MOLINOLO et al., 2007; SQUARIZE et al., 2013).

A mutação observada no gene *PTEN* pode ocorrer em fases iniciais ou tardias da carcinogênese oral. Conforme, Squarize, Castilho e Pinto Júnior (2002), relataram que a mutação de *PTEN* não era um evento iniciador de CEB, e sim um evento tardio. Enquanto que Bian et al. (2012), demonstraram em um estudo experimental em ratos que a ativação da via PI3K/Akt devido à supressão de *PTEN* acontece nas fases iniciais da formação do tumor. Ainda segundo esses autores, a deleção de *PTEN* e de TGF- β (transforming growth factor beta) em combinação com a perda adicional de TGFBR1 (fator receptor de TGF- β Tipo 1), resulta em células com potencial de malignidade que podem progredir para o carcinoma através de perda da senescência e a expansão de células-tronco epiteliais. A diminuição de TGFBR1 também poderia concorrer para a ativação da via do NF- κ B, fato esse que culmina com o aumento da produção de quimiocinas no estroma tumoral. Isso resultaria em um incremento da inflamação, angiogênese e imunossupressão, fatores influenciadores da aquisição do fenótipo maligno.

Hall et al. (2013), publicaram estudo no qual produziram carcinoma epidermoide em cobaias, com objetivo de testar novas drogas para prevenir ou tratar o carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Eles encontraram deleção de dois genes supressores de tumor no epitélio da boca: *TGF β 1* (que é inibidor de proliferação epitelial) e *PTEN* (enzima que regula negativamente a via de sinalização PI3K/AKT e previne o crescimento celular desordenado). Os modelos de camundongos knockout desenvolveram carcinoma epidermoide com penetrância de 100%. Esses tumores induzidos em cobaias, mostraram as mesmas alterações bioquímicas encontradas em CEB em humanos, como, aumento da expressão de citocinas inflamatórias que promovem proliferação e crescimento tumoral. Esses modelos de animais expressaram elevadas quantidades do receptor IL-13R α 2, que se liga com grande afinidade a IL-13 (Interleucina 13), que tem sua expressão aumentada em CEB em humanos. Os autores sugeriram que esse receptor poderia ser alvo de quimioterápicos (IL-13-PE 50 μ g/kg), que aumentaram a sobrevida dos modelos de ratos, sem haver sinais de toxicidade nas doses empregadas.

Lee et al. (2001), analisaram 41 pacientes com carcinoma epidermoide invasivos de língua e a perda de expressão de PTEN ocorreu em 12 (41%) pacientes. A análise do tempo de sobrevida dos pacientes, revelou uma correlação significativa entre a perda de expressão de PTEN e tempo de sobrevida global ($p = 0.03$) e sobrevida livre de eventos ($p = 0.01$). Quando compararam com outros fatores prognósticos clínicos clássicos, tais como o envolvimento de linfonodos ou estadiamento da doença, por meio de análise multivariada para a sobrevida livre de recidiva, o valor prognóstico de PTEN foi mantido, sugerindo que a perda de PTEN pode levar um comportamento biológico mais agressivo nos tumores estudados. Assim, PTEN pode servir como um promissor marcador de prognóstico e ferramenta de intervenção no tratamento do carcinoma epidermoide da língua.

Estudo com 60 pacientes conduzido por Rahmani et al em 2012 mostrou que a perda de expressão de PTEN em amostras clínicas de CEB foi significativamente relacionada com a expressão aumentada de BCL2 (B-cell lymphoma 2). O estudo também mostrou que a perda de expressão de PTEN e expressão aumentada de BCL2 estão significativamente correlacionados com o estadiamento do câncer de boca, e ambas as atividades podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão do carcinoma de boca. Esses resultados sugerem que PTEN pode desempenhar um papel importante na regulação da progressão tumoral e formação de metástases, durante o desenvolvimento do carcinoma oral. A expressão de BCL2 mostrou-se aumentada em tumores de alto grau de malignidade em comparação com tumores menos agressivos.

Gan e Zhang 2009, publicaram um estudo que avaliou os efeitos de uma droga, o trichostatin A (TSA), que é inibidora da enzima Histone deacetylases (HDAC) e o envolvimento da via PTEN/AKT em culturas de células de CEB. Eles demonstraram que o TSA produz inibição do crescimento celular e a apoptose de células de carcinoma epidermoide de boca, com a ativação de PTEN e inativação de AKT. As drogas inibidoras de HDAC poderiam ser potenciais fármacos anti-cancerígenos para quimioterapia do CEB.

Os genes T-BOX pertencem a uma família de genes identificados em camundongos que codificam proteínas conhecidas como TBX, que são fatores de transcrição importantes na proliferação e desenvolvimento celular (TBX2, TBX3, TBX4 e TBX5) A análise da expressão do TBX3 e PTEN em CEB, mostrou que a expressão aumentada de TBX3, provoca diminuição da expressão de PTEN em pacientes com

CEB. A Tbx3 é capaz de reprimir a transcrição de *PTEN*. Essa repressão de *PTEN*, dá a célula neoplásica a capacidade de sobreviver ao controle da apoptose e ganho da capacidade de metastatizar para diferentes órgãos a distância, causando progressão do câncer (BURGUCU et al., 2012).

Won et al. (2012) publicaram um estudo de caso-controle em 2012, que comparou a frequência da mutação de *PTEN* através de Imunoistoquímica e Hibridização *In situ* 121 pacientes com CEB e orofaringe e relacionaram com a presença ou não do HPV. Eles encontraram com maior frequência mutação do *PTEN* em CEB/HPV negativos que em orofaringe, apresentando pior prognóstico. Já na orofaringe esses pacientes apresentaram menor frequência de mutação de *PTEN* e maior frequência de HPV positivos, com melhor prognóstico, sugerindo duas entidades de etiologias diferentes entre o carcinoma epidermóide de boca e o de orofaringe.

O gene *PTEN* tem sido considerado como um marcador de prognóstico em CEB, além dos fatores clínico-patológicos comumente descritos para selecionar pacientes para tratamento complementar com radioterapia e quimioterapia, margens cirúrgicas positivas, invasão de mais de um linfonodo no pescoço, invasão linfonodal extracapsular e tumor de estadiamento maior que T1N0M0 (COOPER et al., 2004; SUWINSKI et al., 2008). Novos marcadores prognósticos baseados em biologia molecular, como a infecção pelo HPV, a expressão do EGFR, Ki-67, p53, nm23, ciclina D (ANG et al., 2002; RAGIN; TAIOLI, et al., 2007) e o *PTEN*, que tem valor prognóstico mais forte que qualquer outra variável considerada, incluindo infiltração de linfonodo no pescoço e expressão de EGFR. Os pacientes com elevada expressão de *PTEN* tem um resultado favorável após a radioterapia com acelerador linear pós-operatória, em comparação com os pacientes tratados com fracionamento convencional e para aqueles com baixa expressão de *PTEN* (SNIETURA et al., 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a expressão da proteína PTEN através da imuno-histoquímica em amostras de pacientes com carcinoma epidermóide bucal.

3.2 Específicos

- a) Correlacionar a imunoexpressão da proteína PTEN com a sobrevida de pacientes diagnosticados com CEB;
- b) Correlacionar a imunoexpressão da proteína PTEN em amostras de CEB com as seguintes variáveis clínicas: idade, gênero, tabagismo, etilismo, localização, tamanho do tumor, envolvimento linfonodal, e estadiamento.
- c) Correlacionar a imunoexpressão da proteína PTEN com o grau histológico de casos CEB;
- d) Correlacionar a imunoexpressão da proteína PTEN com a deleção alélica do gene *PTEN*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção das amostras e variáveis estudadas

Um total de 119 casos de CEB confirmados histopatologicamente foram selecionados através da consulta aos arquivos no banco de dados do Serviço de Patologia Oral do Hospital Universitário João de Barros Barreto, no período entre janeiro de 2007 à dezembro de 2014.

As 119 amostras foram utilizadas para estudar a relação da expressão IHC de PTEN com o grau de diferenciação, que é classificado como bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado (NEVILLE et al 2009)

Para análise da relação da expressão IHC de PTEN com a sobrevida dos pacientes, 52 casos foram selecionados. O critério de inclusão deste grupo, foram cirurgia como única modalidade de tratamento, que permaneceram em acompanhamento ambulatorial por até 60 meses. Os critérios de exclusão foram presença de metástase à distância no momento do diagnóstico, pacientes com prontuários incompletos e perda de seguimento clínico. Estas amostras também foram utilizadas para correlacionar a expressão de PTEN com características clínico-patológicas como idade, gênero, tabagismo, etilismo, localização, tamanho do tumor (T), envolvimento linfonodal metastáticos (N) e estadiamento.

O tumor primário foi clinicamente classificado de acordo com a classificação TNM definido pela UICC 2002 (SOBIN; WITTEKIND, 2002) e pela AJCC (GREENE; PAGE; MORROW, 2002). O diagnóstico clínico e histológico foi baseado nos parâmetros da Organização Mundial de Saúde (BARNES et al., 2005) e foram realizados por dois patologistas do Serviço de Diagnóstico e Cirurgia Bucal do HUIBB da Universidade Federal do Pará. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética e Pesquisa do HUIBB, tendo parecer favorável sob o número 466 de 17 de setembro de 2013.

Além disso, foi também realizada a investigação da deleção de alelos pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente em 42 amostras dentre aquelas que haviam sido testadas para IHC, visto que amostras que apresentavam as bordas do núcleo individual não claramente identificadas foram descartadas, bem como aquelas que possuíam sobreposição nuclear excessiva e aquelas que não apresentavam

marcação uniforme dos núcleos. Foi utilizado como controle positivo adenocarcinoma prostático.

4.2 Análise imuno-histoquímica

As reações foram realizadas em cortes histológicos de 3 μ m de espessura, desparafinizadas em dois banhos de xilol, o primeiro em estufa à 60° C e o segundo em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram hidratados em uma série descendente de etanol 100% (95% e 85%). Para remoção do pigmento formólico, os cortes foram mergulhados em hidróxido de amônio a 10% e etanol a 95%; e após a lavagem em água destilada, as lâminas receberam tratamento para recuperação antigênica. Após esse processo, as secções que seriam submetidas ao anticorpo anti-PTEN foram imersas em 10 mM de solução tampão de EDTA (pH 8,0) e levadas em microondas por 15 min e em seguida lavadas em água destilada. Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram mergulhados em solução de peróxido de hidrogênio 6% e metanol (1:1,v/v) em dois banhos por 15 minutos à temperatura ambiente e em seguida lavadas com solução de Tris (pH 7,4). Posteriormente as lâminas foram submetidas a incubação com o anticorpo primário anti-PTEN (Polyclonal rabbit Anti-PTEN: invitrogen), o qual foi diluída na proporção de 1:100 e incubadas por 16 à 18 horas (overnight) em câmara úmida escura. As lâminas foram submetidas a incubação com o anticorpo secundário (DAKO, Advance HRP Link, CA/USA) e terciário (DAKO, Advance HRP Enzyme, CA/USA) por 30 minutos cada. A revelação da reação foi realizada através da imersão das lâminas em solução de cromógeno diaminobenzidina- DAB (DAB, 3,3; diaminobenzidina; DAKO Corporation) por 5 minutos.

Os cortes foram lavados em água destilada e contra corados com hematoxilina de Meyer e novamente lavados em água destilada. Finalmente, os cortes foram desidratados em etanol em banhos crescentes iniciando no etanol 80% até o etanol absoluto, e diafanizados em dois banhos de xilol e montadas para análise sob o microscópio de luz. As lâminas foram analisadas por dois patologistas.

4.2.1 Análise da imunomarcação

A marcação foi considerada positiva quando houve a presença da coloração castanha, indicando a presença de DAB na reação imuno-histoquímica e considerada negativa para as células que não apresenta esta coloração, tanto em núcleo quanto em citoplasma. O sistema de contagem foi publicado anteriormente na literatura (TSURUTANI et al., 2006). A análise da marcação foi baseada na intensidade e distribuição da marcação. A distribuição das células coradas foi analisada como se segue: 0 (0%), 1 (1-50%) e 2 (51-100%) e a intensidade da marcação foi classificada como se segue: 0 (sem marcação), 1 (marcação ligeira), 2 (marcação moderada) e 3 (marcação forte). O padrão de marcação das amostras foi definido pela somatória dos valores encontrados na distribuição da marcação com os índices da intensidade obtendo-se assim o registro final (FR) da seguinte forma: RF0, RF1, RF2, RF3, RF4 e RF5. Usando este método, RF0, RF1 e RF2 foram considerados marcação negativa, enquanto RF3, RF4 e RF5 foram considerados marcação positiva.

Tabela 1- Distribuição e Intensidade das células por Imunomarcação

INTENSIDADE	DISTRIBUIÇÃO
0 - (sem marcação)	0 - (0%)
1 - (marcação leve)	1 - (1% a 50%)
2 - (marcação moderada)	2 - (51% a 100%)
3 - (marcação forte)	

Registro Final (RF) = Somatória entre os escores da Intensidade e Distribuição

MARCAÇÃO	
NEGATIVA	POSITIVA
RF0, RF1 e RF2	RF3, RF4 e RF5

4.3 Hibridização *in situ* Fluorescente

4.3.1 Pré-Tratamento das lâminas

Primeiramente as lâminas foram incubadas em estufa a 60°C por 2 horas. Em seguida, colocadas em solução de xileno na mesma temperatura por 10 min. Posteriormente as lâminas foram incubadas 2 vezes em xileno e 2 vezes em etanol 100% por um período de 3 min cada passagem e em seguida imersas em ácido acético 70% em temperatura ambiente por 1 min sob leve agitação. Após essa etapa as lâminas foram lavadas 3X em PBS 1X, sendo uma por 1 min e duas por 2 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em 2X SSC (citrato de sódio salino) à 85° C por 30 min. Após este processo, foram realizadas duas lavagens em PBS 1X à temperatura ambiente por 2 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução de pepsina 0,8%/0,1 N HCl por 6 min à 37°C. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas 2 vezes em PBS 1X em temperatura ambiente por 2 min. Por fim, as lâminas foram submetidas à desidratação em concentrações seriais crescentes em etanol 80% e 100% por 3 min cada passagem, e em seguida secas em temperatura ambiente.

4.3.2 Desnaturação e Hibridação

As lâminas foram pré-aquecidas a 37°C por 5 min. Após essa etapa, foram aplicados na lâmina 5 µl de sonda Vysis LSI PTEN SpectrumGreen (1µl de sonda: 4µl de hibridizol) em baixa luminosidade à temperatura ambiente e em seguida aplicada a lamínula. Após este processo, os cromossomos na lâmina e a sonda foram desnaturados simultaneamente por aquecimento em placa quente a 95°C por 10 min e depois incubadas em câmara úmida protegida da luz a 37°C por aproximadamente 16 h.

4.3.3 Revelação e Contra-Coloração

Após a etapa da hibridação, as lâminas foram lavadas em 2X SSC à temperatura ambiente por 5 min e em seguida incubadas em 0,5 X SSC/0,1% Tween

por 5 min a 65°C e posteriormente lavadas em PBS 1X por 2 min. Por fim, foi realizada a contra-coloração com a aplicação na lâmina de 10µl de DAPI e em seguida aplicadas as lamínulas. Por fim, as lâminas foram incubadas em câmara úmida protegida da luz por 10 min à 8°C. Após esse processo, foi realizada a análise em microscópio de fluorescência Olympus BX 41, em que foram contadas 100 células com os sinais da sonda em cada alelo do gene em estudo para cada caso avaliado. Para avaliação dos resultados pela Técnica de Fish alguns critérios foram considerados apropriados para análise como: fixação do tecido, áreas onde as bordas estavam claramente identificáveis, intensidade da fluorescência e a deleção foi considerada quando a presença dos dois sinais alélicos foi inferior a 70% das células analisadas.

4.4 Análise Estatística

A análise estatística teve o objetivo de avaliar os efeitos da presença da proteína PTEN sobre as características clínicas (52 amostras) e histológicas (119 amostras) de pacientes portadores de carcinomas epidermóides de boca. Foram aplicados métodos estatísticos descritivos e inferenciais.

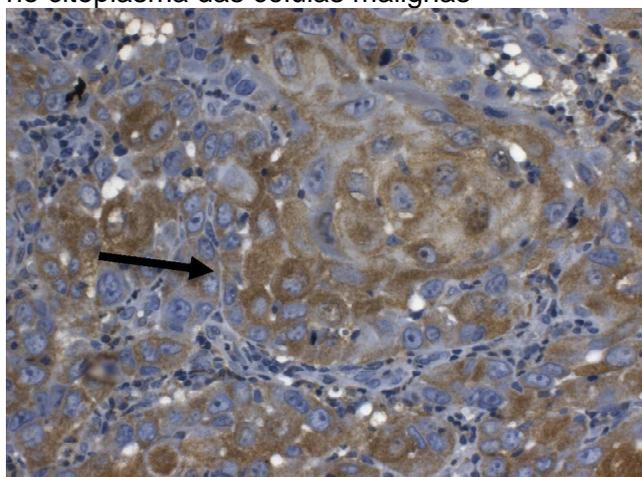
Os dados pela técnica da imunistoquímica foram analisados por meio do software Statistical Package for Social Sciences para Windows, versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). As associações entre a expressão de PTEN e os parâmetros clínicos/histológicos foram examinados para significância estatística por meio do teste do qui-quadrado. Taxas de sobrevida geral foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de log rank. Um valor de $p < 0.05$ será considerado significativo. Para a correlação dos resultados da imunistoquímica com a técnica de FISH foi realizada a análise de dependência. Adicionalmente, foram avaliados os resíduos e níveis de confiança resultantes da análise de correspondência entre as variáveis IHC e resultados de FISH.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão da proteína PTEN em carcinoma epidermóide bucal

Na reação imuno-histoquímica, a expressão de PTEN foi predominantemente citoplasmática nas células neoplásicas, sendo positiva tanto nas células periféricas quanto centrais das ilhas neoplásicas (figura 4).

Figura 4-Representação do padrão de expressão de PTEN nas células neoplásicas, sendo expressa principalmente no citoplasma das células malignas



Fonte: Acervo do HUIBB. Laboratório de Patologia Bucal (2015)

Nota: Seta indicando a expressão citoplasmática de PTEN em coloração marrom.

Dentre os 52 casos selecionados para as variáveis clínico-patológicas a ausência de expressão de PTEN foi observada em 20 casos (38%) de CEB e a expressão positiva foi observada em 32 casos (62%) dos tumores. Ao analisar a variável idade, dois casos possuíam idade igual ou inferior a 40 anos, e 50 casos tinham idade superior a 40 anos, não havendo diferença entre esses dois grupos ($p=0.732$). Em relação ao gênero, 21 casos eram do gênero feminino e 31 do gênero masculino, não havendo diferença estatística significativa entre os casos positivos e negativos nos dois grupos ($p=0.264$). A expressão de PTEN não foi relacionada com o tabagismo, uma vez que 14 casos relataram o hábito de não fumar, sendo 7 positivos e 7 negativos, e 38 relataram o hábito, treze negativos e 25 positivos, não havendo diferença estatisticamente significativa nos dois grupos ($p=0.299$). O etilismo também não teve relação com a expressão de PTEN, 25 casos relataram não consumir

bebidas alcólicas, destes 11 negativos e 14 positivos para PTEN, e 27 relataram consumir bebidas alcoólicas sendo 9 negativos e 18 positivos para expressão de PTEN ($p=0.43$). Em relação a localização, os casos foram divididos em dois grupos língua/assoalho, com 30 casos (12 negativos e 18 positivos), e outra localização, com 22 casos (8 negativos e 14 positivos), não havendo diferença estatística entre as localizações ($p=0.79$). Em relação ao tamanho do tumor, as amostras foram divididas em dois grupos, menor ou igual a 4cm (T1 e T2) ou maior que 4cm (T3 e T4), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando comparado a expressão de PTEN ($p=0.685$). Para a análise do envolvimento linfonodal, as amostras foram divididas em dois grupos um com as amostras com linfonodos menor ou igual a 3 cm (N0 e N1), e outro grupo com envolvimento linfonodal maior que 3 cm (N2 e N3), após a análise estatística não foi observada diferença estatística entre o envolvimento linfonodal com a expressão de PTEN ($p=0.628$). Em relação ao estadiamento, seguiu-se os critérios da American Joint Commission on Cancer, assim foram divididos dois grupos. O primeiro grupo consistiu dos casos classificados em estágio I e II, e o segundo grupo dos casos classificados como III e IV, após a análise estatística não foi observada diferença significativa quando analisada a expressão de PTEN. Os dados referentes aos critérios de idade, gênero, tabagismo, etilismo, localização, tamanho do tumor, envolvimento linfonodal e estadiamento são resumidos na tabela 2.

Tabela 2-Correlação entre PTEN e fatores clínico-patológicos

Características Clinicopatológicas	PTEN				p-valor
	Negativo	(%)	Positivo	(%)	
N =52	20	38,46	32	61,54	
Idade					
<= 40 anos	1	1,92	1	1,92	0,732
> 40 anos	19	36,54	31	59,62	
Gênero					
Feminino	10	19,23	11	21,15	0,264
Masculino	10	19,23	21	40,39	
Fumantes					
Não	7	13,46	7	13,46	0,299
Sim	13	25,00	25	48,08	
Etilismo					
Não	11	21,15	14	26,92	0,430
Sim	9	17,31	18	34,62	
Local					
Língua/Assoalho	12	23,08	18	34,62	0,790
Outro local	8	15,38	14	26,92	
Tamanho					
1 ou 2	7	13,46	13	25,00	0,685
3 ou 4	13	25,00	19	36,54	
N (Metástases em Linfonodos)					
0 ou 1	15	28,85	22	42,31	0,628
2 ou 3	5	9,61	10	19,23	
Estadiamento					
I ou II	4	7,69	11	21,15	0,266
III ou IV	16	30,77	21	40,39	

Fonte: Dados da pesquisa, 2007/2014.

5.2 Correlação da expressão de PTEN com o grau histológico

De um total de 119 casos de carcinoma epidermóide, 31 casos foram negativos para PTEN e 88 casos foram positivos. Dos 119 casos, 23 casos foram considerados bem diferenciados, 57 classificados como moderadamente diferenciados e 39 classificados como pouco diferenciados. Dos 23 casos bem diferenciados, 15 casos (65.2%) foram positivos para PTEN e 8 casos (34.8%) foram negativos. Dos 57 casos classificados como moderadamente diferenciado, 43 casos (75.4%) foram positivos para PTEN e 14 (24,6%) foram negativos. Dos 39 casos classificados como pouco diferenciados, 30 (75%) foram positivos para PTEN e 9 (25%) foram negativos. Ao

analisar estatisticamente os diferentes graus histológicos, percebeu-se que não houve diferença significativa pelo teste de log Rank ($p=0,561$) (Tabela 2).

Tabela 3 - Relação da expressão de PTEN quanto ao grau histológico das amostras analisadas

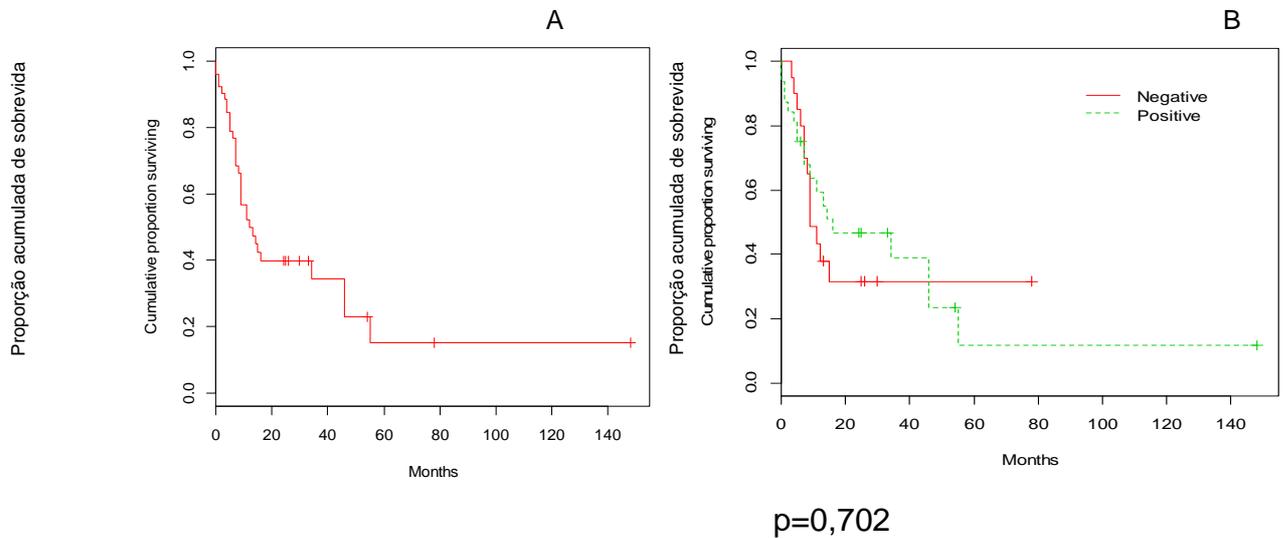
Grau	PTEN				Total
	NEGATIVO	%	POSITIVO	%	
Bem diferenciado	8	25,81	15	17,05	23
Moderado diferenciado	14	45,16	43	48,86	57
Pouco diferenciado	9	29,03	30	34,09	39
Total	31	100,00	88	100,00	119

Fonte: Dados da pesquisa, 2007/2014.

5.3 Análise da Expressão da proteína PTEN com a sobrevida

Após a correlação da expressão de PTEN com as características clínico-patológicas, foi realizada a relação da expressão com a sobrevida dos pacientes. A probabilidade de sobrevivência de um paciente com câncer de boca após um mês de acompanhamento da doença é de 92,3%, com o passar do tempo esta probabilidade tende a diminuir como mostra a figura 5A. De fato, a probabilidade de um paciente sobreviver após 55 meses de acompanhamento é de 15,2%. Pacientes com ausência de marcação em suas amostras tiveram uma pior sobrevida quando comparadas com as amostras positivas porém sem diferença estatística significativa (teste de log-rank, $p=0,702$) (figura 5B).

Figura 5-Curva de sobrevida dos casos de CEB com a expressão de PTEN



Fonte: Dados da pesquisa, 2007/2014.

Nota: Curva de sobrevida geral dos pacientes estudados (A). Curva de sobrevida comparando pacientes (B) com expressão positiva (linha verde tracejada) e negativa (linha vermelha) para PTEN. Mostra que pacientes com expressão negativa possuem uma probabilidade de pior sobrevida, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,702$) com as amostras positivas.

5.4 Análise da sobrevida em função de variáveis clínicas

Adicionalmente à relação da expressão de PTEN com a sobrevida, foi analisada a relação de características clínicas que poderiam influenciar na sobrevida.

Em relação ao gênero, na Curva de Kaplan-Meier observou-se que a probabilidade de sobrevivência de um paciente, do gênero masculino é menor em relação aos pacientes do gênero feminino, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros (teste de log-rank, $p=0.6$) (figura 6A). De maneira semelhante aconteceu com o tabagismo, não havendo diferença estatística significativa entre pacientes fumantes e não fumantes (teste de log-rank, $p=0.476$) (figura 6B). Em relação a localização, ao analisar a Curva de Kaplan-Meier observou-se que a probabilidade de sobrevivência de um paciente com câncer de boca em outro local é significativamente menor em relação a um paciente com câncer de assoalho e língua (teste de log-rank, $p=0.0178$) (figura 6C). A Curva de Kaplan-Meier indica que a probabilidade de sobrevivência de um paciente com câncer de boca de tamanho 3 ou 4 cm é significativamente menor que para um paciente com câncer de tamanho 1 ou 2 cm (teste de log-rank, $p = 0.00266$) (figura 6D). A Curva de Kaplan-Meier indica que a probabilidade de sobrevivência de um paciente com câncer de boca

com metástases em linfonodos 2 ou 3 cm é significativamente menor que para pacientes com metástases em linfonodos 0 ou 1 cm (teste de log-rank $p = 0.00121$) (Figura 6E). A Curva de Kaplan-Meier indica que a probabilidade de sobrevivência de um paciente com câncer de boca com estadiamento III ou IV é significativamente menor que para um paciente com estadiamento I ou II (teste de log-rank, $p = 0,0018$) (Figura 6F). Adicionalmente, foram selecionadas as variáveis com maior risco de morte, e assim, foi calculado o risco de óbito dos pacientes através do teste de Cox, mostrando que a variável N (2 ou 3) contribui significativamente ($p < 0,05$) para o aumento do risco de ocorrer o evento (óbito). Assim, um paciente com N = 2 ou 3 cm tem risco 4 vezes maior de ir a óbito do que um paciente com N = 0 ou 1 cm (Tabela 4).

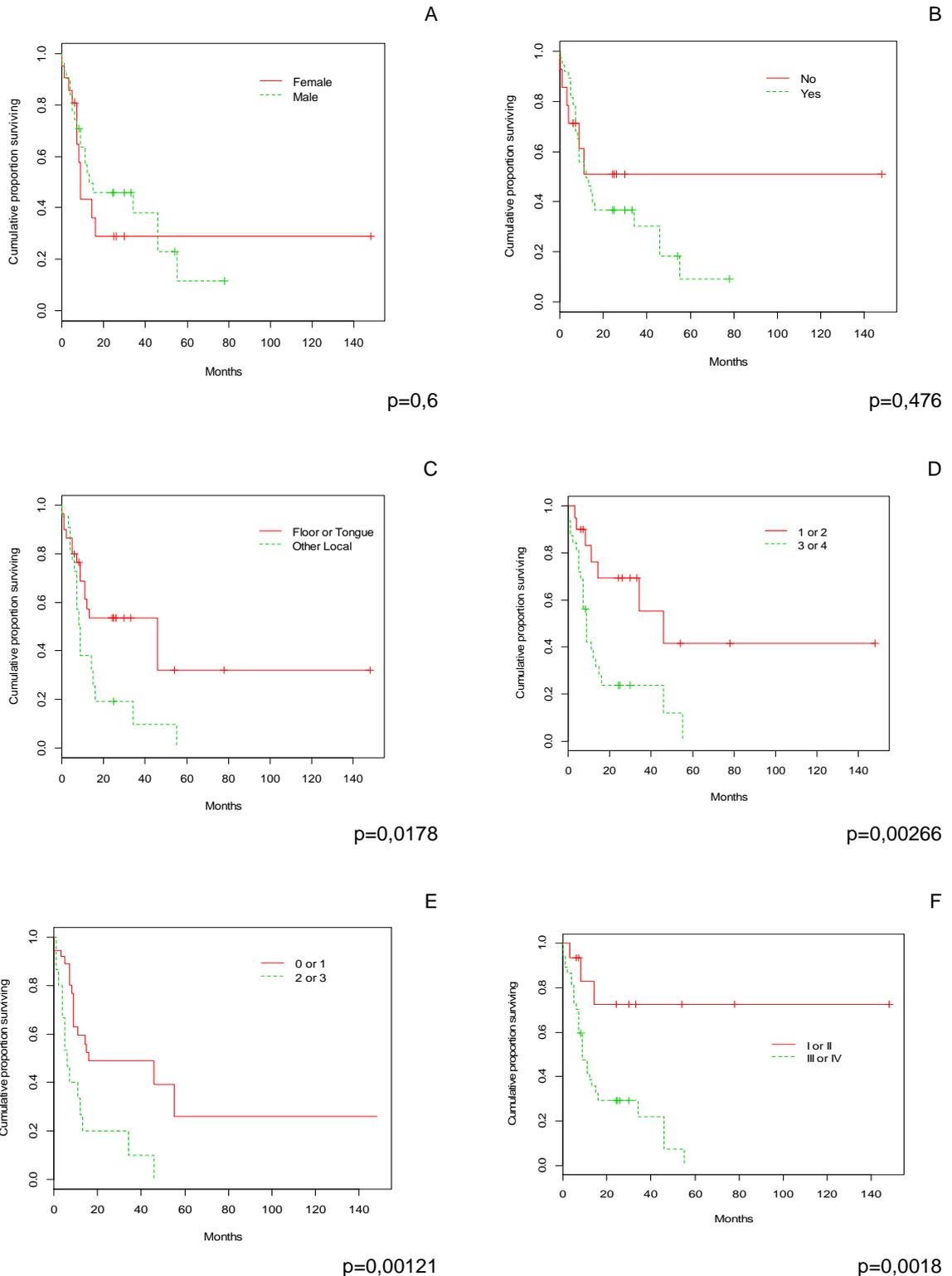
Tabela 4 - Razão de risco para que as variáveis estudadas conduza ao óbito

Variável	beta	Razão de Risco	SE	z	p-valor	(95% I.C)	
PTEN Positivo	0.0047	1.0047	0.4077	0.012	0.9908	0.4519	2.234
Gênero masc	-0.6888	0.5022	0.4920	-1.400	0.1615	0.1915	1.317
Fumante	-0.3668	0.6930	0.6005	-0.611	0.5413	0.2136	2.248
Outro local	0.7550	2.1277	0.4127	1.829	0.0673	0.9475	4.778
T3 ou 4	1.0861	2.9628	0.6380	1.702	0.0887	0.8484	10.347
N2 ou 3	1.5118	4.5350	0.4829	3.130	0.0018	1.7599	11.686
Estad III ou IV	0.4062	1.5011	0.9014	0.451	0.6523	0.2565	8.785

Fonte: Dados da pesquisa, 2007/2014.

Nota: Tabela mostrando a razão de risco para as variáveis positivas para PTEN, gênero masculino, fumante, outra localização, T3/4, N2/3 e estadiamento III/IV, mostrando que casos com envolvimento linfonodal maior que 3 cm tem quatro vezes mais o risco de óbito que tumores menor de 3cm ($p=0,0018$).

Figura 6-Curva de Kaplan-Meier em relação ao sexo, tabagismo, localização, tamanho do tumor, envolvimento linfonodal e estadiamento.



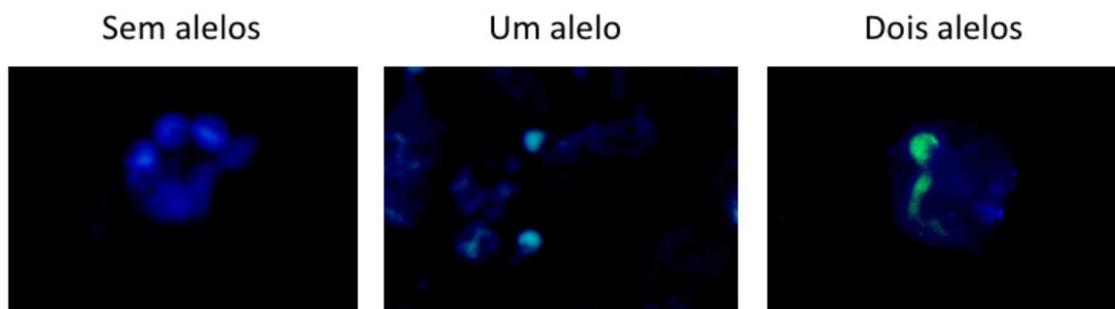
Fonte: Dados da pesquisa, 2007/2014.

Nota: A Curva A mostra a sobrevivência de pacientes do gênero masculino (linha verde tracejada) em comparação ao gênero feminino (linha vermelha) não havendo diferença estatística entre os grupos ($p=0,6$) (A). Curva de Kaplan-Meier mostrando a sobrevivência entre pacientes fumantes (linha verde) e pacientes não-fumantes (linha vermelha tracejada) não havendo diferença estatística entre eles ($p=0,476$) (B). Curva de Kaplan-Meier mostrando a melhor sobrevivência de lesões localizadas em assoalho e língua (linha vermelha) em relação a outros sítios (linha verde tracejada) (teste de log-rank, $p=0,0178$) (C). A Curva de Kaplan-Meier indica que a probabilidade de sobrevivência de lesões T3 e T4 (linha verde tracejada) é significativamente menor que para lesões T1 ou T2 (linha vermelha) ($p = 0,00266$) (figura 6D). A Curva de Kaplan-Meier mostrando que lesões N2 ou N3 (linha verde tracejada) é significativamente menor que para pacientes N0 ou N1 cm (linha vermelha) ($p = 0,00121$) (figura 6E). A Curva de Kaplan-Meier mostrando a sobrevivência de um paciente com câncer de boca com estadiamento III ou IV (verde tracejada) é significativamente menor que para um paciente com estadiamento I ou II (linha vermelha) ($p = 0,0018$) (figura 6F).

5.5 Resultado Hibridização *In Situ* Fluorescente

De 42 amostras utilizadas para investigar deleção de alelos pela técnica de FISH, 15 casos apresentaram alelos deletados e 27 mostraram-se não deletados. As lâminas foram analisadas pela presença do sinal fluorescente, categorizadas em sem alelos, um alelo e dois alelos (Figura 7). Adicionalmente, foi realizada a correlação estatística pelos testes análise de dependência para saber se a perda de expressão imunoistoquímica de PTEN poderia ser correlacionada com a deleção dos alelos, e através deles foi confirmada a dependência entre as variáveis IHC e FISH (figura 7B). O mapa perceptual apenas indica as possíveis associações, por isso, analisamos também os resíduos da análise de correspondência (figura 7C). A figura 7D apresenta os resíduos e os níveis de confiança resultantes da análise de correspondência entre as variáveis IHC e resultados de FISH. Nela, observa-se que os níveis de confiança indicam associação significativa entre expressão IHC negativa e o resultado da técnica de FISH deletado e entre expressão IHC positiva e o resultado da técnica de FISH não deletado, sugerindo que a baixa expressão de PTEN pode estar relacionada com a deleção dos alelos. Ressalta-se que as associações são significativas a um nível maior ou igual a 70%. Portanto, é possível afirmar que a análise estatística da deleção de PTEN foi correlacionada com a ausência de expressão da proteína enquanto que a não-deleção foi correlacionada com sua presença ($p < 0.005$).

Figura 7-Análise de FISH nas amostras de CEB e a correlação com a imuno-histoquímica
A

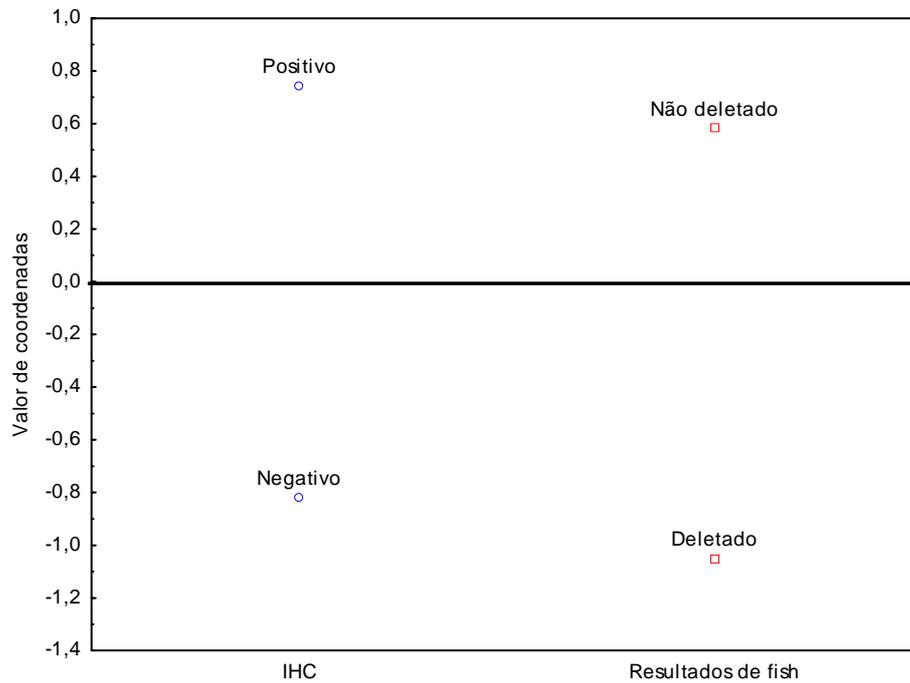


B

Variáveis	χ^2	g.l	p	B
IHC e os resultado de FISH	25,666 7	1	0,00 0	24,6 7

Nota: g.l. = graus de liberdade; p = p-valor.

C



D

IHC	Resultados de FISH	
	Deletado	Não deletado
Negativo	5,07 (100,00)	-5,07 (0,00)
Positivo	-5,07 (0,00)	5,07 (100,00)

Fonte: Dados da pesquisa, 2007/2014.

Nota: representação dos resultados de fluorescência, em verde, nas células neoplásicas, mostrando células com a ausência dos alelos (A1), com um alelo (A2) e com dois alelos (A3). Em B, resultado dos testes de análise de dependência para verificar a relação entre as variáveis IHC e os resultados de FISH. Em C, mapa perceptual das variáveis Imuno-histoquímica e resultados de FISH, mostrando que os casos positivos na IHC são não-deletados no FISH, e casos negativos na IHC são relacionados com a deleção dos alelos. Em D, Resíduos e níveis de confiança resultantes da Análise de Correspondência entre as variáveis IHC e resultados de FISH, mostrando que casos negativos na IHC são deletados no FISH e casos positivos na IHC são não-deletados no FISH.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a imunexpressão de PTEN, através da técnica de imunohistoquímica, e avaliar a condição dos alelos do gen *PTEN*, através da técnica de FISH, em amostras de CEB, bem como correlacionar estes achados à variáveis clínicas-patológicas e à sobrevida dos pacientes. Além disso, este estudo também verificou a deleção alélica por meio da técnica de FISH. Através da técnica de imunohistoquímica pode-se definir o fenótipo por meio da análise da expressão molecular em células e tecidos. A proteína PTEN é expressa basalmente na maior parte dos tecidos humanos e perda alélica ou completa de *PTEN* é frequentemente observada em diferentes tipos de doenças malignas que conduzem a uma ativação das vias AKT/mTOR. A análise IHC determina o nível de expressão de PTEN em amostras histológicas, mas não é capaz de demonstrar deleções do tipo parciais ou heterozigotas, para as quais análises por FISH são as mais apropriadas. A interpretação dos resultados de IHC é o ponto mais crítico na avaliação da expressão de PTEN, uma vez que essa proteína pode ser utilizada tanto como um factor de prognóstico e/ou como uma ferramenta para guiar a intervenção terapêutica e resposta à terapia (CASTILLO-MARTIN et al., 2016).

Em 1997, *PTEN* foi identificado pela primeira vez como um gene relevante localizado no cromossomo 10. Foi também observada sua frequente ausência em amostras de tumores malignos de estágio avançado (TAMGUNEY; STOKOE, 2007). Adicionalmente, a baixa expressão desta proteína foi observada em diferentes malignidades, incluindo câncer de próstata, mama, cérebro, endométrio (MUTTER et al., 2000), glioblastomas (DUERR et al., 1998) e melanomas (TSAO et al., 1998). Isto ocorre especialmente através de mutações, deleções, silenciamento transcricional ou instabilidade da própria proteína PTEN. Em função destes achados, esta proteína foi selecionada para este estudo pelo fato desta ser expressa por um gene supressor tumoral envolvido em diferentes processos celulares, que quando ausente e/ou inativado, apresenta papel proeminente no desenvolvimento de neoplasias malignas (SNIETURA et al., 2012).

Ainda de acordo com as inferências do estudo de SNIETURA et al., 2012, a faixa etária encontrada variou entre 50 e 70 anos, o que corrobora os achados do presente estudo, onde aproximadamente 96% dos pacientes com idade acima de 40 anos. Ao lado disso, esta pesquisa encontrou uma incidência maior de tumores em

pacientes do sexo masculino (59%), ratificando os resultados de Arshad et al. (2012). Esta diferença pode estar relacionada ao fato de homens estarem mais expostos à fatores de risco, como uma dieta pouco equilibrada e ao consumo de tabaco e álcool, apesar de haver uma recente mudança comportamental no que diz respeito à exposição à esses fatores no gênero feminino (NASHER et al., 2014).

Além disso, estudos relacionam o envelhecimento celular à uma hiperativação da PI3K/mTOR, que por sua vez está relacionada à perda alélica ou completa de PTEN (BAJWA et al., 2016). Nessa linha de pensamento, pacientes com idade avançada, além de terem exposição prolongada à fatores de risco, também apresentam maiores chances de possuírem PTEN silenciado.

No que diz respeito à etiologia, é bem definida na literatura a importância e a participação do tabaco e do álcool como fatores de risco associados ao desenvolvimento do CEB (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2012). Esta informação se confirma também neste estudo, visto que a maioria dos pacientes participantes (73%) eram fumantes e consumidores de álcool (51%). Outro dado importante presente na literatura associa a deleção do gene *PTEN* com uso de tabaco, demonstrando sua íntima relação com o desenvolvimento de CEB. Squarize et al (2013) combinaram a administração oral de tabaco com a deleção condicional do gene *PTEN* em camundongos, criando um modelo animal genético e ambiental específico para CEB. Os autores observaram uma superatividade da cascata PI3K/AKT/mTOR, que resultou no desenvolvimento de carcinomas orais específicos.

Quanto à sua localização, a língua e mucosa bucal vêm sendo reportados como os locais de maior incidência do CEB (GUPTA et al., 2015). Contudo, nossos resultados revelaram a língua e o assoalho bucal como sítios mais comuns de aparecimento dessas lesões. Dentre eles, 34,6% tiveram expressão positiva e 23,08% expressão negativa para PTEN respectivamente.

Ao analisarmos o tamanho das lesões, envolvimento linfonodal e seu estadiamento clínico, observamos que aproximadamente 61% das lesões possuíam mais de 4 cm e tinham envolvimento linfonodal maior do que 3 cm, e aproximadamente 71% das lesões foram classificadas com estadiamento III ou IV seguindo os critérios da American Joint Committee on Cancer. Estas variáveis são importantes pois individualizam e guiam as opções de tratamento mais apropriadas para cada caso (GUILLEMAUD et al., 2010). Adicionalmente, Rajapakshe et al (2015) e Geum et al (2013) afirmam que o estadiamento TNM é o fator de maior significância no

prognóstico de paciente com CEB. Nosso estudo, entretanto, não observou nenhuma associação estatística significativa de tais variáveis com a expressão da proteína PTEN.

No que diz respeito à sobrevida dos pacientes relacionada às variáveis clínicas acima citadas, foi observado que pacientes que possuíam envolvimento linfonodal (N) classificado como 2 ou 3, ou seja, maior do que 3 cm, possuíam risco de ir a óbito 4 vezes maior do que um paciente com N = 0 ou 1. Isto é clinicamente relevante no contexto de recomendações do American Joint Committee on Cancer, o qual recomenda exploração cervical eletiva quando o risco de metástase linfonodal regional for maior do que 20% (ALKUREISHI et al., 2008).

Além disso, Kim et al. 2012 observaram que quanto maior o estadiamento clínico da lesão, há uma diminuição na sobrevida específica de cinco anos de pacientes com CEB tratados unicamente com cirurgia. O mesmo estudo também verificou que a taxa de sobrevida específica de 5 anos de acordo com o envolvimento linfonodal foi de 93,2% para pacientes N0, 66,7% para pacientes N1 e 0% para pacientes N2 (KIM et al., 2012). Observa-se portanto, um decréscimo na sobrevida de pacientes conforme maior seja seu envolvimento linfonodal, o que corrobora os achados do presente estudo.

Considerando a comparação entre a análise da deleção alélica do Gene *PTEN* com a expressão IHC de sua proteína correspondente, nosso estudo demonstra uma associação significativa entre as duas variáveis. A expressão IHC negativa está relacionada ao gene deletado, enquanto que a expressão IHC positiva está relacionada ao gene não deletado. Este achado ratifica o estudo de Ettl et al (2012), que ao verificar o papel de PTEN como supressor tumoral em uma amostra considerável e representativa de neoplasias malignas de glândulas salivares, observaram também por meio da técnica de FISH, que tanto deleções hemi e homozigóticas de *PTEN* estavam intimamente relacionadas com a perda da expressão IHC da proteína.

7 CONCLUSÃO

- A expressão de PTEN não foi correlacionada com uma melhor sobrevida dos pacientes, e nem com outros critérios como idade, sexo, tabagismo, alcoolismo, localização, tamanho do tumor, envolvimento linfonodal e estadiamento.

- A expressão de PTEN não foi correlacionada com o grau histológico de CEB.

- A sobrevida dos pacientes estudados foi correlacionada apenas com os critérios, tamanho de tumor, envolvimento linfonodal e estadiamento.

- Houve correlação entre a deleção de *PTEN* com ausência da expressão, assim como a não deleção está relacionada com a presença da sua proteína.

REFERÊNCIAS

- ABNET, C. C. et al. Tooth loss and lack of regular oral hygiene are associated with higher risk of esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 17, p. 3062-3068, Nov. 2008.
- ABOUNADER, R. Interactions between PTEN and receptor tyrosine kinase pathways and their implications for glioma therapy. **Expert Rev Anticancer Ther.** v.9, n.2, p. 235–245, Feb. 2009.
- ALKUREISHI, L. W et al. Does tumor depth affect nodal upstaging in squamous cell carcinoma of the head and neck? **Laryngoscope.**v.4, n. 118, p.629-634, 2008.
- ANG, K. K. et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. **Cancer Res.** v.15, p.7350–7356, 2002.
- ARSHAD, R. et al. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol,** v. 5, n.9, p.965-971. 2012.
- BAI, Z. et al. PTEN expression and suppression of proliferation are associated with Cdx2 overexpression in gastric cancer cells. **Int J Oncol,** v.42, n.5, p.1682-1691, May, 2013.
- BAJWA, P. Et al. Age related increase in mTOR activity contributes to the pathological changes in ovarian surface epithelium. **Oncotarget,** v. 7, n. 15, p. 19214- 19227, Mar. 2016.
- BARNES, L. et al. Oral cavity and oropharynx. In: IARC. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005. p.163–208.
- BIAN, Y.et al. Loss of TGF- β Signaling and PTEN Promotes Head and Neck Squamous Cell Carcinoma through Cellular Senescence Evasion and Cancer-related Inflammation. **Oncogene.** v.31, n.28, p.3322–3332, July, 2012.
- BLOCHING, M. et al. The influence of oral hygiene on salivary quality in the Ames Test, as a marker for genotoxic effects. **Oral Oncol,**v.43, n.9, p.933-939, Oct. 2007.
- BOESPFLUG, Amélie et al. Primary lung adenocarcinoma occurring in a PTEN related syndrome (Cowden's disease): routine EGFR sequencing also highlights two rare somatic mutations S768I and V769L. **Lung Cancer,** v.79,n.3, p.318-20, 2013.
- BOYLE, J. O. et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. **Cancer Res,** v.53, p.4477, Oct. 1993.
- BRENNAN, J.A. et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med,** v.332, n.11, p.712-717, Mar.1995.

BURGUCU, D. et al. Tbx3 represses PTEN and is over-expressed in head and neck squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, n.12, p.1471-2407, Oct. 2012.

CANTLEY, L.C. The Phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v.296, n.5573, p.1655–1657, May, 2002.

CASTELLANO, E.; DOWNWARD, J. Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.346, p.143-169, June 2010.

CASTILLO-MARTIN, M. et al. Immunopathologic Assessment of PTEN Expression. **Methods Mol Biol**, v.1388, p.23-37. 2016.

CHALHOUB, N ; BAKER, S.J. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. **Annu Rev Pathol**, v.4, p.127–150, July, 2009.

CHANG, F. et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, v.17, p.590–603, 2003.

CHOW, L.M. L.; BAKER, S. J. PTEN function in normal and neoplastic growth. **Cancer Letters**, v. 24, n.2, p.184-196, Sept. 2006.

CIDADO, J.; PARK, B.H. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway for Breast Cancer Therapy. **J Mammary Gland Neoplasia**, v. 17, n. 3/4, p. 205-216, Dec. 2012.

COOPER, J.S. et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med**, v.350, n.19, p.1937–1944, May, 2004.

CULLY, M. et al. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. **Nature**, v,6, n.3, p.184-92, Mar. 2006.

DUERR, E.M. et al. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. **Oncogene**, v.16, n. 17, p.2259-2264, Apr. 1998.

ETTL, T. et al. Loss of PTEN is associated with elevated EGFR and HER2 expression and worse prognosis in salivary gland cancer. **Br J Cancer**, v.106, n.4, p.719-726, Feb. 2012.

FRANCESCHI, S. et al. Risk factors for cancer of the tongue and the mouth. A case-control study from northern Italy. **Cancer**, v.70, n.9, p.2227-2233. Nov. 1992.

FREEMAN, D, J. et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase dependent and – independent mechanisms. **Cancer Cell**, v.3, n.3, p.117-130, Feb. 2003.

FURNARI, F.B. Et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev**, v. 21, n.21, p.2683-2710, Nov. 2007.

GALBIATTI, ALS et al. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Braz. J Otorhinolaryngol**, São Paulo, v.79, n. 2, p. 239-247, Mar./Apr. 2013.

GANLY, I. et al. p53 alterations in recurrent squamous cell cancer of the head and neck refractory to radiotherapy. **Br J Cancer**, v.82, n.2, p.392, Jan. 2000.

GAN, Y.H.; ZHANG, S. PTEN/AKT pathway involved in histone deacetylases inhibitor induced cell growth inhibition and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells **Oral Oncology**, v. 45. n.10, p.150–154, Oct. 2009.

GERICKE, A; MUNSON, M.; ROSS, A. H. Regulation of PTEN phosphatase. **Gene**, v.374, p.1-9. June 2006.

GEUM DH, ROH YC, YOON SY, KIM HG, et al. The impact factors on 5-year survival rate in patients operated with oral cancer. **J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.**, v.39, n.5, p.207-216, Oct. 2013.

GIUDICE, F. S.; SQUARIZE CH. The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. **J Carcinog Mutagen**. Suppl 5. p. 1-32. Aug. 2013.

GOSPODAROWICZ, M.; WITTEKIND, C.; SOBIN, L. **TNM Classification of Malignant Tumours**. 7th ed. Dec. 2009. Disponível em: <www.uicc.org>. Acesso em: 10.05.2016.

GREENE, F.L.; PAGE, D.; MORROW, M. **AJCC cancer staging manual**. 6th ed. New York: Springer, 2002.

GUILLEMAUD, J.P. et al. Prognostic impact of intraoperative microscopic cut-through on frozen section in oral cavity squamous cell carcinoma. **J Otolaryngol Head Neck Surg**, v.39, n.4, p.370–7, Aug. 2010.

GUPTA, K. et al. To evaluate disparity between clinical and pathological tumor-node-metastasis staging in oral cavity squamous cell carcinoma patients and its impact on overall survival: An institutional study. **South Asian J Cancer**, v.4, n.4, p.183-185, Oct./Dec. 2015.

HADDADIN, K. J et al. Natural history and patterns of recurrence of tongue tumours. **Br J Plast Surg**, v. 53, n.4, p. 279-285, June, 2000.

HAGEN, Bek; SIMON JUNIOR, Raphael. Comparative study of the expression of p53, Ki67, E-cadherin and MMP-1 in verrucous hyperplasia and verrucous carcinoma of the Oral cavity. **Head Neck Pathol**. v.1, n. 2, p.118–122, Oct. 2007.

HALL, Bradford. et al. Targeting of interleukin-13 receptor $\alpha 2$ for treatment of head and neck squamous cell carcinoma induced by conditional deletion of TGF- β and PTEN signaling. **Journal of Translational Medicine**, v.11, p.45, Feb. 2013.

HAUPT, Susan et al. Apoptosis - the p53 network. **J Cell Sci**, v.116, p.4077-4085, 2003.

HERS, Ingeborg; VINCENT, E. E; TAVARÉ, J.M. Akt signalling in health and disease. **Cell Signal**, v.23, n.10, p.1515–1527, Oct. 2011.

HOLLSTEIN, M. et al. p53 mutations in human cancers. **Science**, v. 253, n.5015, p.49-53, July 1991.

HUSSEINY, G.E et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue: an analysis of prognostic factors. **Br J Oral Maxillofac Surg.**, v. 38, n.3,193-199. June 2000.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Estimativa 2016**: Incidência do câncer no Brasil. 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>. Acesso em: 05.07.2016.

JANKU, Filip et al. PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. **Mol Cancer Ther**, v.10, n.3, p.558–565, Mar. 2011.

JOHNSON, N. W; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A. A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. **Periodontol 2000**, v.57, n.1, p.19-37, Oct. 2011.

KANAMORI, Y. et al. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. **Clin Cancer Res**, v.7, n,4, p.892-895. Apr. 2001.

KATSO, R. et al. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.17, p.615–675. 2001.

KECHAGIOGLOU, P. et al. Tumor Suppressor PTEN in Breast Cancer: Heterozygosity, Mutations and Protein Expression. **Anticancer Res**, v.34, n.3, p.1387-400, Mar. 2014.

KIM, K. Y.; CHA, I. H. The Identification of significant chromosomal regions correlated with oral tongue cancer progression. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 138, n.10, p. 1667-1677, 2012.

KOHN, K.W.; POMMIER, Y. Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the off-on switch of p53 in response to DNA damage. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 331, n.3, p.816-827, June 2005.

KUDO, Y. et al. Invasion and metastasis of oral cancer Cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous B-catenin. **Clin. Cancer Res**, v.10, n.16, p. 5455-5463, Aug. 2004.

LATTA, E.; CHAPMAN, W.B. PTEN mutations and evolving concepts in endometrial neoplasia. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol**, v.14, p.59-65. Feb. 2002.

LEE, J.I. et al. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.127, n.12, p.1441-1445, Dec. 2001.

LI, G. et al. The mechanism involved in the loss of PTEN expression in NSCLC tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 418, n.3, p.547 – 552, Feb. 2012.

LI, J. et al. *PTEN*, a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain, Breast, and Prostate Cancer. **Science**, v. 275, n. 1943, p. 1943-1947, Mar. 1997. DOI: 10.1126/science.275.5308.1943

LINDENBLATT, R.C. et al. Oral squamous cell carcinoma grading systems--analysis of the best survival predictor. **J Oral Pathol Med**, v. 41, n. 1, p. 34-39, Sept. 2012.

LO, W. L. et al. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 61, n.7, p. 751-758, July 2003.

LUI, L. et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. **Cancer Discov**, v.3, n.7, p.761-769, July 2013.

MAYO, L. D.; DONNER, D. B. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. **Trends Biochem Sci.**, v. 27, n. 9, p. 462-7, Sept. 2002.

MING, M.; HE, Y. PTEN in DNA Damage Repair. **Cancer Letters**. 28; v.312, n.2, p.125-129, June, 2012.

MOLINOLO, A.A. et al. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. **Clin Cancer Res**, v.13, n.17, p.4964-4973, 2007.

MORAL, M. et al. Akt activation synergizes with Trp53 loss in oral epithelium to produce a novel mouse model for head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 69, n.3, p.1099–1108, Feb. 2009.

MORENO-LÓPEZ, L.A. et al. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. **Oral Oncol**, v.36, n.2, p.170-174, Mar. 2000.

MURUGAN, A.K; MUNIRAJAN, A.K; TSUCHIDA, N. Ras oncogenes in oral cancer: the past 20 years. **Oral Oncol**, v. 48, n.5, p.383-392, May, 2012.

MUTTER, G.L. et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. **J Natl Cancer Inst**, v.92, n.11, p.924-930, June 2000.

MYERS, M. P. et al. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.17, p.9052-9057, Aug. 1997.

NASHER, A.T. et al. Viral infection and oral habits as risk factors for oral squamous cell carcinoma in Yemen: a case-control study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v.118, n.5, p.566-572, Nov. 2014.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral & Maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

ODILE, D. PTEN and Cancer. In: HAYAT, M.A. (Ed.). **Handbook of Immunohistochemistry and in situ Hybridization of Human Carcinomas: Molecular Genetics Liver Carcinoma, and Pancreatic Carcinoma**. Oxford, UK: Elsevier, 2005. 3v.

OGAWARA, Y. et al. Akt Enhances Mdm2-mediated Ubiquitination and Degradation of p53. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n. 24, 14, p. 21843-21850, June, 2002.

OKI, E. et al. Genetic mutual relationship between PTEN and p53 in gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 227, p.33-38, Sept. 2005.

PATHARE, S. M et al. Clinicopathological and prognostic implications of genetic alterations in oral cancers. **Oncology Letter**, v. 2, n.3, p.445-451, May, 2011.

PLANCHON, S. M.; WAITE, K.; ENG, C. The nuclear affairs of PTEN. **J Cell Sci**, v.121, p. 249-253, Feb. 2008.

PONTES, H.A.R. et al. P-Akt and its relationship with clinicopathological features and survival in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. **J Oral Pathol Med**, v. 44, n.7, p1-6. 2014.

PRADELLA, L.M. et al. A Novel deleterious PTEN mutation in a patient with early-onset bilateral breast cancer. **BMC Cancer**, v.14, p.70. 2014.

RAGIN, C.C.; TAIOLI, E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. **Int J Cancer** v.121, n.8, p.1813–1820, Oct. 2007.

RAHMANI, A. et al. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v.5, v.9, p.965-971, 2012.

RAJAPAKSHE, R.M et al. A retrospective analysis to determine factors contributing to the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol**, v.39, n.3, p.360-366. June, 2015.

RAO, S. V. K. et al. Epidemiology of Oral Cancer in Asia in the Past Decade- An Update (2000-2012). **Asian Pac J Cancer Prev**, v.14, n.10, p. 5567-5577, 2013.

SAMUELS, Y. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, v.304, n. 5660, p.554, Apr. 2004.

SCULLY, C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.16, n.3, p.306-11, May, 2011.

SEBASTIAN, P. et al. Anterior tongue cancer with no history of tobacco and alcohol use may be a distinct molecular and clinical entity. **J Oral Pathol Med**, v.43, n.8, p.593-599, Sept. 2014.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v.62, p.1, 10-29, Jan./Feb. 2012.

SKINNER, H. D. et al. TP53 disruptive mutations lead to head and neck cancer treatment failure through inhibition of radiation-induced senescence. **Clin Cancer Res**, v.18, p.290-300, Jan. 2011.

SNIETURA, M. et al. PTEN as a Prognostic and Predictive Marker in Postoperative. Radiotherapy for Squamous Cell Cancer of the Head and Neck. **PLoS ONE**, v. 7, n.3, 2012.

SONG, M.S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.13, n.5, p.203-296, Apr. 2012.

SQUARIZE, C.H.; CASTILHO, R.M.; PINTO JÚNIOR, D.S. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. **J Oral Pathol Med**, v.31, n.7, p. 379-784, Aug. 2002.

SQUARIZE, C.H. et al. PTEN Deficiency Contributes to the Development and Progression of Head and Neck Cancer. **Neoplasia**, v.15, n.5, p. 461-471, May, 2013.

STECK, P.A. et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nat Genet**, v.15, n.4, p.356-362, 1997.

STRANSKY, N. et al. The Mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. **Science**, v.333, n. 6046, p.1157-1160, Aug. 2011.

SUWINSKI, R. et al. Randomized clinical trial on 7-days-a-week postoperative radiotherapy for high-risk squamous cell head and neck cancer. **Radiother Oncol**, v.87, n.2, p.155-163, May, 2008.

TAN, M.; MYERS, J.N.; AGRAWAL, N. Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. **Genomics Otolaryngol Clin North Am**, v. 46, n.4, p.545–566. Aug.2013.

TANG, J. M. et al. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. **Lung Cancer**, v.51, n.2, p.181-191, Feb. 2006.

TAMGUNEY, T.; STOKOE, D. New insights into PTEN. **J Cell Sci**. v.120, n.Pt 23, p.4071-4079, Dec. 2007.

TEZAL, M. et al. Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.18, n.9, p. 2406-2412, Sept. 2009.

TSAO, H.S. et al. Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. **Oncogene**, v.16, n.26, p. 3397-3402, July 1998.

TSURUTANI, J et al. Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small-cell lung cancer tumors. **Clin Oncol**, v.24, n.2. p. 306-314, Jan. 2006.

VIGNESWARAN, N.; WILLIAMS, M.D. Epidemiologic Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. **Oral Maxillofacial Surg Clin N Am**, v. 26, n. 2, p. 123–141, May, 2014.

VORA, H. H. et al. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. **J Surg Oncol**, v.82, n. 1, p.34-50. Jan. 2003.

WALLIN, J. J. et al. Nuclear phospho-Akt increase predicts synergy of PI3K inhibition and doxorubicin in breast and ovarian cancer. **Sci Transl Med**, v. 2, n.48, p.66, Sept. 2010.

WARNAKULASURIYA, S.; SUTHERLAND, G.; SCULLY, C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. **Oral Oncol**, v.41, n.3 p.244-260, Mar. 2005.

WON, H.S. Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.48, n.10, p.985-990, Oct. 2012.

XU, J. et al. Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. **Cancer**, v.83, n.2, p.204-212, 1998.

XU, W.T; YANG, Z.; LU, N.H. Roles of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) in Gastric Cancer Development and Progression. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, p.17-24, 2014.

YU, Z. et al. PTEN associates with the vault particles in HeLa cells. **J Biol Chem**, v.277, n.43, p.40247-40252, Oct. 2002.

YU, Z. et al. Phosphorylation of Akt (Ser473) predicts poor clinical outcome in oropharyngeal squamous cell cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.16, n. 3, p.553–558, Mar. 2007.

YUN, F. et al. Clinicopathological significance of PTEN and PI3K/AKT signal transduction pathway in non-small cell lung cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v.6, n.10, p.2112-2120, Sept. 2013.

ZHANG, S; YU, D. PI (3) Kinase Apart PTEN's Role in Cancer. **Clin Cancer Res**, v.16, n. 17, p.4325-4330, Sept. 2010.