



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

VALDENIRA DE JESUS OLIVEIRA KATO

**SIGNIFICADO DA EXPRESSÃO DE p16^{INK4A} E DA PERDA DE
HETEROZIGOSIDADE DO GENE PTEN NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE
BUCAL RELACIONADO AO PAPILOMAVIRUS HUMANO**

BELÉM

2023

VALDENIRA DE JESUS OLIVEIRA KATO

**SIGNIFICADO DA EXPRESSÃO DE p16^{INK4A} E DA PERDA DE
HETEROZIGOSIDADE DO GENE PTEN NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE
BUCAL RELACIONADO AO PAPILOMAVIRUS HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como exigência para obtenção do título de Doutora em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano.

Coorientador: Prof. Dr. Diego Di Felipe Ávila Alcantara.

BELÉM

2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

K11s Kato, Valdenira de Jesus Oliveira.
Significado da expressão de p16INK4A e da perda de heterozigosidade do gene PTEN no carcinoma epidermóide bucal relacionado ao papilomavírus humano / Valdenira de Jesus Oliveira Kato. — 2023.
60 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano
Coorientador(a): Prof. Dr. Diego Di Felipe Ávila Alcantara
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2023.

1. Carcinoma epidermóide bucal. 2. HPV. 3. p16. 4. PTEN. 5. Sobrevida. I. Título.

CDD 614.59994098115

VALDENIRA DE JESUS OLIVEIRA KATO

**SIGNIFICADO DA EXPRESSÃO DE p16^{INK4A} E DA PERDA DE
HETEROZIGOSIDADE DO GENE PTEN NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE
BUCAL RELACIONADO AO PAPILOMAVIRUS HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Doutora em Neurociências e Biologia Celular.

Data da avaliação:/ / 2023

BANCA EXAMINADORA:

Professor Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano

Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, UFPA
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA (Presidente)

Professor Dr. Diego Di Felipe Ávila Alcântara

Hospital Ophir Loyola – HOL
Diretoria de Ensino e Pesquisa – DIEP/HOL (Coorientador)

Professora Dra. Bárbara do Nascimento Borges

Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, UFPA
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA (Membro Titular).

Professora Dra. Patrícia Ferreira Nunes

Hospital Ophir Loyola, HOL
Laboratório de Biologia Molecular – LABMOL/HOL (Membro Titular)

Professora Dra. Carla de Castro Sant'Anna

Hospital Ophir Loyola, HOL
Diretoria de Ensino e Pesquisa – DIEP/HOL (Membro Titular).

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir a realização desta obra.

Aos meus pais, Osvaldo Nascimento de Oliveira (*in memoriam*) e Rosemira Souza de Oliveira, irmãs e sobrinhas pela companhia constante e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Ao orientador, Prof.Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano, foi um privilégio tê-lo como orientador. Quero agradecê-lo pela paciência, motivação e incentivo ao longo de toda a pesquisa. Tenho certeza que fui guiada pelo melhor. Gratidão me define.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Diego Di Felipe Ávila Alcântara por sua coorientação no meu trabalho de conclusão de curso de doutorado. Sua dedicação e conhecimento foram fundamentais para o sucesso deste projeto. Sou grato pela oportunidade de tê-lo como coorientador.

Aos professores, do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, pelos ensinamentos visando um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo do curso.

Aos Professores, Prof.^a Dra. Carolina Heitmann M. Azevedo, Prof.^a Dra. Edna Cristina Franco, Dra. Carla de Castro Santanna e Prof. Dr. Douglas Magno Guimarães pela amizade e grandiosa ajuda científica no decorrer da formação deste estudo e pelo apoio constante em todos os momentos solicitados. Meu eterno agradecimento.

Aos colegas da turma do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, pelo companheirismo durante o curso.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

E a todos os colegas e familiares que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

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

RESUMO

Os genes p16 e PTEN fazem parte da família dos genes supressores de tumor comumente associados à inativação de uma variedade de cânceres humanos. A perda de sua expressão tem sido estudada mundialmente no Carcinoma Epidermóide Bucal (CEB). Neste estudo, avaliou-se a hipótese de que p16 coopera com PTEN inativo durante a patogênese do CEB, especialmente na agressividade e proliferação do tumor. Para tanto, utilizou-se 119 amostras de CEB nas quais foram avaliadas a relação entre a infecção por HPV, a expressão de p16 e mutações em PTEN através das técnicas de imunohistoquímica (IHC), western blot e imunofluorescência e sequenciamento. Os resultados deste estudo demonstraram que PTEN possui alta positividade em pacientes com tumor de tamanho mais avançado ($p < 0,01$) e metástase linfonodal ($p = 0,02$). A análise estatística evidenciou que a expressão de p16 foi fortemente associada à presença de HPV ($p < 0,0001$), mas que sua expressão aberrante não está relacionada com PTEN alterado ($p = 0,52$). Observou-se também que 60% das amostras em estágio IV (estágio avançado do tumor) estavam estatisticamente associadas a presença de mutação. Conclui-se que PTEN e p16 são genes supressores que controlam a progressão tumoral. No estudo atual, PTEN demonstrou maior reatividade em estágios avançados da doença (superior a sete vezes). O p16 foi fortemente associado ao HPV, mas não demonstrou associação significativa com nenhum fator clínico-patológico analisado. Ambas as proteínas apresentam grande importância no prognóstico dos pacientes. Foi demonstrado que a presença viral diminui a agressividade do tumor. Lesões em estágios avançados apresentam menor sobrevida, além disso, a presença de mutação foi mais comumente observada em estágios avançados da doença. Observou-se que pacientes fumantes com ausência de p16 estão significativamente associados a uma taxa de sobrevida duas vezes menor.

Palavras chave: carcinoma epidermóide bucal; HPV; p16; PTEN; sobrevivência.

ABSTRACT

The p16 and PTEN genes are part of the family of tumor suppressor genes commonly associated with the inactivation of a variety of human cancers. The loss of its expression has been studied worldwide in oral squamous cell carcinoma (OSCC). In this study, we evaluated the hypothesis that p16 cooperates with inactive PTEN during OSCC pathogenesis, especially in tumor aggressiveness and proliferation. For that, 119 OSCC samples were used in which the relationship between HPV infection, p16 expression and PTEN mutations were evaluated through immunohistochemistry (IHC), western blot, immunofluorescence and sequencing techniques. The results of this study demonstrated that PTEN has high positivity in patients with more advanced tumor size ($p < 0.01$) and lymph node metastasis ($p = 0.02$). Statistical analysis showed that p16 expression was strongly associated with the presence of HPV ($p < 0.0001$), but that its aberrant expression is not related to altered PTEN ($p = 0.52$). It was also observed that 60% of the samples in stage IV (advanced stage of the tumor) were statistically associated with the presence of mutation. It is concluded that PTEN and p16 are suppressor genes that control tumor progression. In the current study, PTEN showed great reactivity in advanced stages of the disease (greater than seven times). p16 was strongly associated with HPV, but did not show a significant association with any clinical-pathological factor analyzed. Both proteins are of great importance in the prognosis of patients. Viral presence has been shown to decrease tumor aggressiveness. Lesions in advanced stages have a shorter survival, in addition, the presence of mutation was more commonly observed in advanced stages of the disease. It was observed that smoking patients with the absence of p16 are significantly associated with a survival rate twice as low.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; HPV; p16; PTEN; survival.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fatores de predisposição para o CEB	18
Quadro 2 - Funções da proteína PTEN intranuclear	24
Quadro 3 - Funções da proteína p53 e as consequências de alterações de seu nível no núcleo.	25
Quadro 4 - Relação da expressão da PTEN em CEB	26
Quadro 5 - Consequências da ativação das vias PI3K/Akt e NF- κ B na ausência de PTEN.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT	<i>Alpha Serine/Threonine-Proteinkinase</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CDK	Cinase Dependente de Ciclina
CEB	Carcinoma Epidermoide bucal
CEE	Carcinoma de Células Escamosas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FISH	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
FR	Registro Final
GST	Glutathione-S-Transferase
HDAC	Histonas Desacetilases
HNSCC	Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço
HOL	Hospital Ophir Loyola
HPV	Vírus do Papilomavirus Humano
HRAS	<i>RAt Sarcoma virus</i>
HR-HPV	Genótipos de Alto Risco do Papilomavirus Humano
HUJBB	Hospital Universitário João de Barros Barreto
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAPK	<i>Mitogen-activated proteinkinases</i>
MDM2	<i>Murine Doble Minute 2</i>
MGMT	Metilguanina-DNA Metiltransferase
MMAC1	<i>Mutated in Multiple Advanced Cancers 1</i>
MTHFR	Enzima Metilenotetrahidrotalase
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NAB	N-nitrosoanabasine
NAT	N-nitrosoanatabina

NF- κ B	<i>Factor Nuclear Kappa B</i>
NNK	4-metil-N-nitrosamina
NNN	N-nitrosornicotina
NSCLC	Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células
OSCC	Carcinoma de células escamosas oral
OPSCC	Carcinoma de células escamosas de Orofaringe
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDK	Pyruvate dehydrogenase kinase
PI2P	Fosfatidilinositol 4-5 Bifosfato
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Cinase
PI3P	Fosfatidilinositol 3-4-5-Trifosfato
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homologue Chromosome</i>
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido Ribonucleico
SOD	Superóxido Dismutase
SPF	Síndrome da Polipose Familiar
TBX	<i>T-box proteins</i>
TEP	<i>TGFβ-Regulated and Epithelial Cell-enriched Phosphatase</i>
TGFBR1	<i>Transforming Growth Factor Beta Receptor 1</i>
TSA	<i>Trichostatin A</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
URR	<i>Upstream Regulation Region</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Carcinoma Epidermóide Bucal (CEB).....	02
1.2 Correlação entre fatores de risco e CEB	04
1.3 Tratamento CEB	06
1.4 Gene <i>CDKN2A</i>	07
1.5 Gene <i>PTEN</i>	09
1.6 PTEN em Carcinoma Epidermóide Bucal.....	14
1.7 Papilomavírus Humano (HPV).....	16
1.8 HPV em Carcinoma Epidermoide Bucal.....	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 Geral.....	19
2.2 Específicos.....	19
CAPÍTULO I - SIGNIFICANCE OF P16INK4A EXPRESSION AND PTEN LOSS OF HETEROZYGOSITY IN HUMAN PAPILLOMA VIRUS-RELATED ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA	20
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

O Carcinoma epidermoide bucal (CEB) é a mais comum lesão da cavidade oral e representa 90% das neoplasias malignas que ocorre nesse sítio anatômico. Apesar dos avanços no tratamento em torno da quimioterapia, radioterapia e técnicas cirúrgicas, estudos têm demonstrado que a sobrevivência dos pacientes com esta neoplasia ainda é muito baixa, variando de 30% a 50% após 5 anos de acompanhamento (GALBIATTI *et al.*, 2013; PATHARE *et al.*, 2011). Apesar da interação sinérgica entre tabagismo e consumo de álcool estar bem descrita como fatores de risco significativos, nas últimas décadas estudos epidemiológicos têm demonstrado um papel importante das infecções por papilomavirus humano (HPV) de alto risco em CEB, predominantemente na tumorigênese da orofaringe de pacientes considerados jovens, ou seja, abaixo dos 45 anos e é mais comumente observado em homens do que em mulheres. (BERSANI *et al.*, 2018; FURNISS *et al.*, 2009; JIANG; DONG, 2017; NASHER *et al.*, 2014).

O HPV apresenta tropismo pelo tecido da tonsila palatina e o genoma do HPV pode ser integrado ao ácido desoxirribonucleico (DNA) do paciente e então começar a expressar a oncoproteína E6 que se combina com o fator regulador do ciclo celular p53, resultando em sua degradação e levando à proliferação de células malignas. A proteína E7 se liga ao gene do retinoblastoma (Rb), provocando a liberação de E2F, que dá origem a distúrbios do ciclo celular. A infecção pelo HPV resulta em transformação maligna do tecido normal (HUSAIN; NEYAZ, 2017; WANG *et al.*, 2017).

Sabe-se que a carcinogênese oral é um processo complexo caracterizado pela expressão aberrante de genes e proteínas. Nesse contexto, a investigação de alterações na expressão de p16 e no status do gene *Phosphatase and Tensin Homologue Chromosome* (PTEN) ganhou notoriedade proeminente (JUREL *et al.*, 2014; NIKITAKIS *et al.*, 2018). Por exemplo, a superexpressão da proteína supressora de tumor p16 foi reconhecida como um marcador substituto confiável para infecção oncogênica por HPV (DESCHUYMER *et al.*, 2018; FAKHRY *et al.*, 2017). Esta proteína é membro da família INK4 de inibidores de CDK que funcionam no controle do ciclo celular que normalmente é expresso em um nível baixo em células normais. Mas nas células cancerosas infectadas pelo HPV, o E7 pode se ligar ao pRb e formar um complexo. O complexo E7-pRB causa a liberação do fator de transcrição E2F do complexo pRb-E2F, que normalmente restringe a transcrição do gene p16. Assim, ao serem infectadas pelo HPV, as células-alvo expressam abundantemente p16 através do mecanismo de interação entre pRb e a proteína viral E7 do HPV, favorecendo a progressão do

ciclo celular no câncer. A superexpressão da proteína p16 no Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (HNSCC) relacionado ao HPV devido à capacidade da proteína viral E7 de se ligar ao pRB causando a desregulação da p16. O p16 também é sugerido como marcador de prognóstico clínico para pacientes com CEB de cabeça e pescoço, uma vez que os casos positivos para p16 tiveram melhorano tratamento em comparação com os negativos para p16(LU *et al.*, 2018; MOLINOLO *et al.*, 2012).

PTEN é um gene supressor de tumor bem estabelecido e um regulador negativo da via Fosfatidilinositol 3-Cinase (PI3K) /*Alpha Serine/Threonine-Proteinkinase* (Akt)/*Mammalian TargetofRapamycin* (mTOR), uma vez que a perda de funcionalidade de PTEN resulta em hiperativação de Akt (JUNG *et al.*, 2019; PONTES *et al.*, 2018). O silenciamento de PTEN por hipermetilação ocorre em muitas mutações da linhagem germinativa em tumores primários e metastáticos. Alguns exemplos disso foram encontrados na Síndrome Polipose Familiar (SPF), que é uma doença rara em que os pacientes têm um risco elevado de desenvolver câncer de mama, tireóide, endométrio, ovário, colorretal e carcinoma renal e aumento da incidência de melanoma. A hipermetilação do promotor PTEN foi relatada também em câncer de colo de útero, colorretal, esôfago, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular, pulmão e câncer de cabeça e pescoço (HNSCC) (LOU *et al.* 2016).

Nessa perspectiva, se inserem os estudos que buscam biomarcadores moleculares que auxiliem no entendimento da patogênese de neoplasias malignas (PONTES *et al.*, 2015). É importante ressaltar que a perda da expressão de PTEN foi encontrada em 29% dos cânceres de língua e a perda de heterozigosidade foi identificada em 40% dos HNSCCs, o que tem sido relacionado à piores resultados após a radioterapia adjuvante (LEE *et al.*, 2001; SNIETURA *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2017).

Com base no que foi exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo fornecer uma visão sobre a expressão de p16INK4A como um potencial marcador prognóstico, bem como a relevância da perda adicional de heterozigosidade do gene PTEN e o nível de expressão dessa proteína em CEB em uma coorte proveniente do Norte do Brasil.

1.1 Carcinoma Epidermóide Bucal (CEB)

A prevalência do CEB em diferentes países e regiões é demonstrada por dados epidemiológicos que evidenciam um número em torno de 95% de todos os tumores malignos diagnosticados na cavidade oral (LO *et al.*, 2003; VIGNESWARAN; WILLIAMS, 2014).O monitoramento realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que o número de

novos casos de câncer da cavidade oral no Brasil será de 15.100 novos casos para o triênio 2023-2025, sendo a quinta neoplasia maligna mais comum em homens com 11.180 casos, correspondendo a 10,69 casos novos a cada 100 mil homens, e a sexta em mulheres com 4.010 novos casos, correspondendo a 3,71 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2023). O carcinoma de células escamosas oral é responsável por nove em cada dez lesões malignas diagnosticadas (LO *et al.*, 2003; VIGNESWARAN; WILLIAMS, 2014).

No Pará, o Hospital Ophir Loyola (HOL), centro de referência no tratamento do câncer, registrou 2952 admissões de pacientes oncológicos no ano de 2020. Desse total, 1196 casos (40.5%) foram em homens e 1756 (59.5%) em mulheres, bem como uma incidência de 62.47% dos casos em pessoas entre 50 a 79 anos e 31.06% entre 20 a 49 anos. A Tabela 1 mostra o número de casos de câncer por localização primária.

Vale ressaltar que deste número total de atendimentos pode-se observar que para o câncer de cavidade oral 130 casos foram atendidos no HOL.

Tabela 1 - Número de casos de câncer por localização primária do tumor do Pará atendidos no HOL, em 2020. (continua)

Localização tumor primário	n (%)
Mama	489 (16.5)
Colo de útero	396 (13.4)
Estômago	265 (8,98)
Próstata	225 (7.72)
Pelenão melanoma	214 (7.25)
Cólon e reto	191 (6.47)
Leucemia, medula óssea*	120 (4.07)
Tireóide	108 (3.66)
Pulmão	92 (3.12)
Linfoma, não especificado	87 (2.95)
Lábio e cavidade oral	81 (2.74)
Rim	75 (2.54)
Ossos e partes moles	67 (2.27)
SNC	54 (1.83)
Ovário	51 (1.73)
Fígado e vias biliares intra-hepáticas	50 (1.69)
Pâncreas	47 (1.59)
Corpo de útero	43 (1.46)
Esôfago	38 (1.29)
Bexiga	37 (1.25)
Laringe	33 (1.12)
Pênis	32 (1.08)
Não especificado	30 (1.02)
Sistema hematopoiético e reticuloendotelial, não medula óssea	23 (0.78)
Testículo	17 (0.58)
Vesícula biliar e vias biliares extra-hepáticas	15 (0.51)

Tabela 1 - Detalhamento do número de casos de câncer por localização primária do tumor do Pará atendidos no HOL, em 2020. (conclusão)

Localização tumor primário	n (%)
Intestino delgado	10 (0.34)
Nasofaringe	10 (0.34)
Vulva	8 (0.27)
Aparelho digestivo, não especificado	8 (0.27)
Ocular	7 (0.24)
Faringe	6 (0.20)
Mediastino	5 (0.17)
Cavidade nasal e ouvido médio	5 (0.17)
Seios paranasais	4 (0.14)
Vagina	4 (0.14)
Placenta	3 (0.10)
Aparelho respiratório, sem especificação	1 (0.03)
Timo	1 (0.03)
Total	2952 (100.00)

Fonte: Hospital Ophir Loyola

1.2 Correlação entre fatores de risco e CEB

O hábito de fumar tabaco é o fator predisponente mais importante para o desenvolvimento do CEB. Ao observar aspectos do tabagismo (frequência do hábito, quantidade e tipo de fumo), observa-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 fumantes de cigarros com alta concentração de substâncias nocivas podem ter um aumento do 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. Portanto, 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, pois os riscos associados ao consumo de cigarros crescem com o aumento do consumo, ou seja, existe um efeito de dose-resposta (FRANCESCHI *et al.*, 1992; MORENO-LÓPEZ *et al.*, 2000; SEBASTIAN *et al.*, 2014).

Dentre as substâncias carcinogênicas existentes no tabaco, destacam-se as N-nitrosaminas: N-nitrosornicotina (NNN), 4-metil-N-nitrosamina (NNK), N-nitrosoanatabina (NAT) e N-nitrosoanabasine (NAB), além de radicais livres que impedem a ação de enzimas antioxidantes glutathiona-S-transferase (GST), glutathiona-redutase, superóxido dismutase (SOD), catalase, e glutathiona peroxidase (SCULLY, 2011).

A exposição persistente do trato aerodigestivo superior aos carcinógenos do tabaco causa alterações genéticas que afetam a mucosa da boca, nariz, faringe, traqueia, brônquios e pulmões. Tais alterações persistem por muitos anos, mesmo quando o paciente pára de fumar.

Há também aumento de tumores em outros sítios, devido à circulação no sangue de cancerígenos absorvidos para outros órgãos, tais como, esôfago e bexiga. Existem ainda outras possíveis consequências adversas para a saúde: doença pulmonar obstrutiva crônica e doença cardíaca aterosclerótica (SCULLY, 2011; WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND; SCULLY, 2005).

Outro fator importante a ser considerado é o consumo isolado de álcool, que 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 os riscos (BLOCHING *et al.*, 2007). Assim, a combinação do abuso do álcool e tabaco por longos períodos pode aumentar o risco de uma pessoa adquirir o CEB em mais de 15 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. Contudo, essa patologia tem aumentado em mulheres em muitas partes do mundo especialmente em função das mudanças comportamentais da sociedade atual (JOHNSON; JAYASEKARA; AMARASINGHE, 2011; NASHER *et al.*, 2014; KRISHNA RAO *et al.*, 2013).

O CEB acomete, geralmente, pacientes a partir da sexta década de vida, portanto, pacientes com menos de 45 anos são considerados jovens. A relação do CEB com a idade ocorre tanto pelo aumento do tempo de exposição do indivíduo ao carcinógeno quanto pela alteração no equilíbrio metabólico e hormonal do indivíduo que propicia falhas na defesa contra os processos de iniciação e promoção do processo neoplásico (VORA *et al.*, 2003). Em relação aos locais de acometimento, a língua e o soalho bucal são os sítios mais comuns de origem do CEB, representando aproximadamente 50% das amostras, sendo também o principal local em pacientes que não apresentam o hábito de fumar e naqueles pacientes considerados jovens (VORA *et al.*, 2003).

A má higiene bucal também é um fator etiológico para o desenvolvimento do Carcinoma de Células Escamosas Oral (OSCC) (SUN *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2021). Bloching *et al.* (2007) conduziram um estudo clínico prospectivo e verificaram que tanto a presença de constituintes genotóxicos da placa dental, como a polimicrobiota, quanto o estado precário de conservação da dentição dos indivíduos, podem possuir relevante interação mutagênica atuando como cofator no processo da carcinogênese. Dentre estes aspectos, destaca-se o índice de placa, número de dentes extraídos e a não reabilitação protética, assim como, fatores relacionados à atividade genotóxica de elementos encontrados na saliva.

Portanto, a higiene 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. Assim, a má higiene bucal mostrou ser um fator de aumento de riscos para câncer de cabeça e pescoço (BLOCHING *et al.*, 2007).

Quando comparados com pacientes com boa higiene periodontal, pacientes com periodontite também foram mais propensos a ter CEB pouco diferenciado (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). O Quadro 1 resume os principais fatores relacionados a predisposição do CEB.

Quadro 1 - Fatores de predisposição para o OSCC.

Tabagismo	<ul style="list-style-type: none"> - Frequência; - Quantidade; - Tipo de fumo; - Concentração de substâncias nocivas; - Tempo (duração) do hábito; - Substâncias carcinogênicas existentes.
Etilismo	<ul style="list-style-type: none"> - Combinação com o tabaco; - Liberação de substâncias genotóxicas; - Tempo (duração) do hábito.
Má higiene bucal	<ul style="list-style-type: none"> - Polimicrobiota (constituintes genotóxicas); - Índice de placa (constituintes genotóxicas); - Número de dentes extraídos; - Não reabilitação protética.
Outros	<ul style="list-style-type: none"> - Gênero (2♂:1♀); - Herança genética; - Hábitos culturais; - Idade.

Fonte: Adaptado de Sunet *al.* (2022).

1.3 Tratamento CEB

Em relação a escolha do tratamento a ser realizado, este 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 (MARUR; FORASTIERE, 2016).

Convém ressaltar que a terapia é baseada no estadiamento tumoral. Os casos mais localizados (estádios I e II) são tratados com ressecção cirúrgica ou radioterapia isoladamente. Já os casos localmente avançados (estádios III e IVA/B) ressecáveis ou irressecáveis, são tratados com quimioterapia a base de platina com ou sem quimioterapia de indução. Nos casos metastáticos o tratamento é baseado no status de *performance* do paciente, utilizando

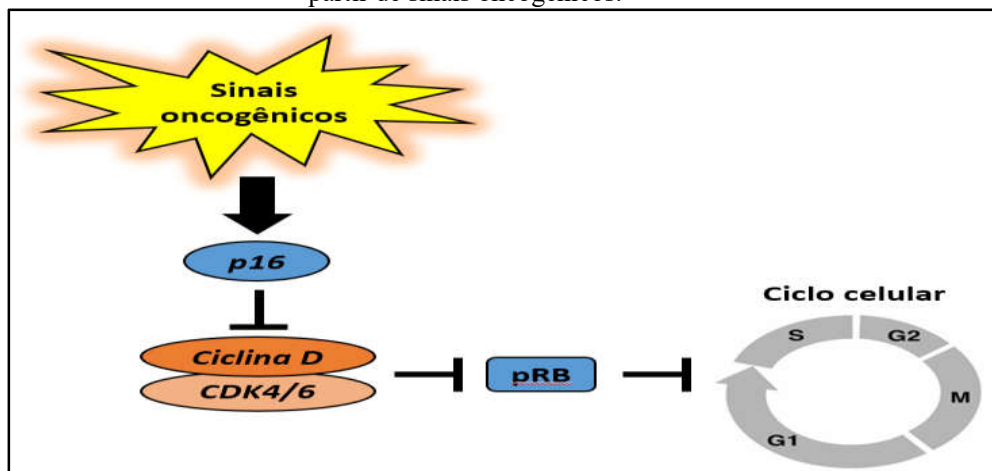
quimioterapia combinada nos casos que possuem boa *performance* e quimioterapia com um único agente para os casos com baixa *performance* (MARUR; FORASTIERE, 2016).

1.4 Gene *CDKN2A*

Em biologia molecular, estudos recentes mostraram que o desenvolvimento de diversos tipos de tumores está relacionado, basicamente, a duas classes de genes: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Enquanto os proto-oncogenes estão associados à regulação da proliferação celular, os genes supressores tumorais estão relacionados ao controle negativo do ciclo de divisão celular (SUGERMAN; JOSEPH; SAVAGE, 2005). Evidências sugerem que estes genes quando alterados, ou expressos impropriamente, podem induzir o processo oncogênico. Assim, a inativação de genes supressores de tumor está entre os mecanismos genéticos mais comuns envolvidos na transformação maligna (REED *et al.*, 1996).

O gene supressor de tumor *CDKN2A*, mapeado na banda p21 do cromossomo 9, codifica um inibidor específico das cinases dependente de ciclinas (CDK) 4 e 6. Deste modo, a proteína p16 desempenha um papel fundamental nas redes supressoras de tumor por meio da indução da senescência celular que atua como uma barreira para a transformação celular por sinais oncogênicos, suprimindo o crescimento de tumores através do controle negativo do ciclo de divisão celular. Para tanto, a proteína p16 inibe as CDK4 e 6 no ponto de checagem G1, para que a célula entre na fase G0 (quiescência) até que um dano ocorrido no DNA possa ser corrigido (Figura 1).

Figura 1 - Envolvimento de p16 na parada do ciclo celular mediada por pRB induzida a partir de sinais oncogênicos.



Fonte: Adaptado de Kotakeet *al.* (2015).

Nota: A expressão de p16 é induzida por sinais oncogênicos, resultando em parada em G1 mediada pela proteína pRB a fim de proteger as células da hiperproliferação.

A proteína p16 é relativamente estável e sua expressão é regulada principalmente pelo controle transcricional, porém, sua inativação ou ausência permite que a célula entre na fase S após uma breve parada na fase G1, sem que a restauração das alterações do DNA ocorra (FURTADO *et al.*, 2010). Deste modo, a proteína p16 tem recebido atenção especial como um biomarcador de diagnóstico de lesões, com o potencial de ser usada em uma ampla gama de cânceres humanos (KOTAKE *et al.*, 2015; MURPHY *et al.*, 2005).

A perda do gene supressor de tumor e amplificação do crescimento promovendo genes são eventos frequentes no processo de tumorigênese. Múltiplas vias são desreguladas no processo de tumorigênese via de sinalização WNT/ β -catenin, via de resposta a danos do DNA e via de manutenção telomérica são as vias significativas que se regulam no processo de progressão do câncer (PADHI *et al.*, 2015). CDKN2A/p16, é um gene supressor de tumor e é relatado ser frequentemente alterado na progressão do CEB (SORIA *et al.*, 2001). Uma exclusão homozigótica no gene CDKN2A/P16 é relatada em vários tumores sólidos devido às suas propriedades supressoras tumorais (SORIA *et al.*, 2001).

Padhi *et al.*; (2015) mostrou um envolvimento direto do gene CDKN2A/p16 no câncer bucal. A imuno-histoquímica de p16 das seções teciduais revelou uma expressão muito baixa de proteína nas amostras recorrentes em comparação com as não recorrentes. No tumor maligno, houve um aumento na expressão de p16 e Ki-67 significando seu papel na transformação maligna (PRIGGE *et al.*, 2015). A desregulação do CDKN2A/p16 tem sido frequentemente alterada durante o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas orais (LIM *et al.*, 2014). Os casos recorrentes mostraram uma expressão genética CDKN2A/p16 regulamentada em comparação com os não recorrentes que confirmam a perda genética em casos recorrentes, onde outros estudos relatam a associação de várias mutações em genes supressores de tumores a serem frequentemente revogadas na OSCC (SORIA *et al.*, 2001).

Um estudo recente investigou a relação entre metilação de p16 e sua expressão no CEB, além da investigação quanto à contribuição de fatores clinicopatológicos, infecção pelo HPV e tabagismo na expressão P16 e metilação promotora. Neste estudo foram incluídos 67 pacientes com CEB e 59 indivíduos sem CEB. Todos os pacientes foram candidatos à cirurgia da cavidade oral e biópsias de tumores frescos foram coletadas e processadas para extração de DNA e RNA. Tecidos gengivais normais foram coletados de indivíduos encaminhados à clínica odontológica e considerados como controles. Todos os casos e controles foram verificados para infecção pelo HPV e, em seguida a metilação e expressão do gene P16 foram

determinados por meio de PCR específico de metilação (MSP) e PCR em tempo real (qPCR), respectivamente. A metilação de p16 em tumores e tecidos normais foi de 59,7 e 38,9%, respectivamente. A maioria das amostras hipermetiladas (>82%) estava em notas altas. A metilação de p16 foi comparável em pacientes com HPV + e HPV ou fumantes. O P16 foi superexpresso (~3vezes; $p=0,044$) em tumores HPV+, mas foi significativamente menos regulado em pacientes fumantes (40% de todos os tumores). A comparação da expressão P16 em tumores OSCC com diferentes graus de metilação promotora sugerem ainda a relação da taxa de metilação e a baixa regulação da expressão P16. A metilação e expressão P16 foram afetadas diferencialmente em pacientes com infecção pelo HPV e nos casos de fumante. Independentemente da influência dos fatores ambientais, verificou-se que o estado P16 é útil para classificar pacientes com CEB e para influenciar estratégias de tratamento de acordo com essa classificação. Além disso, direcionar a regulação do p16 pode ser uma opção terapêutica promissora (ALLAMEH *et al.*,2019).

1.5 Gene *PTEN*

O gene *Phosphatase and Tensin Homologue Chromosome* (PTEN), também denominado de *Mutated in Multiple Advanced Cancers 1* (MMAC1) ou *TGF β -Regulated and Epithelial Cell-enriched Phosphatase* (TEP), é um gene supressor de tumor de 200 kb localizado no cromossomo 10 (10q23) que foi descrito pela primeira vez em 1997 por diferentes pesquisadores (LI *et al.*, 2012; STECK *et al.*,1997).

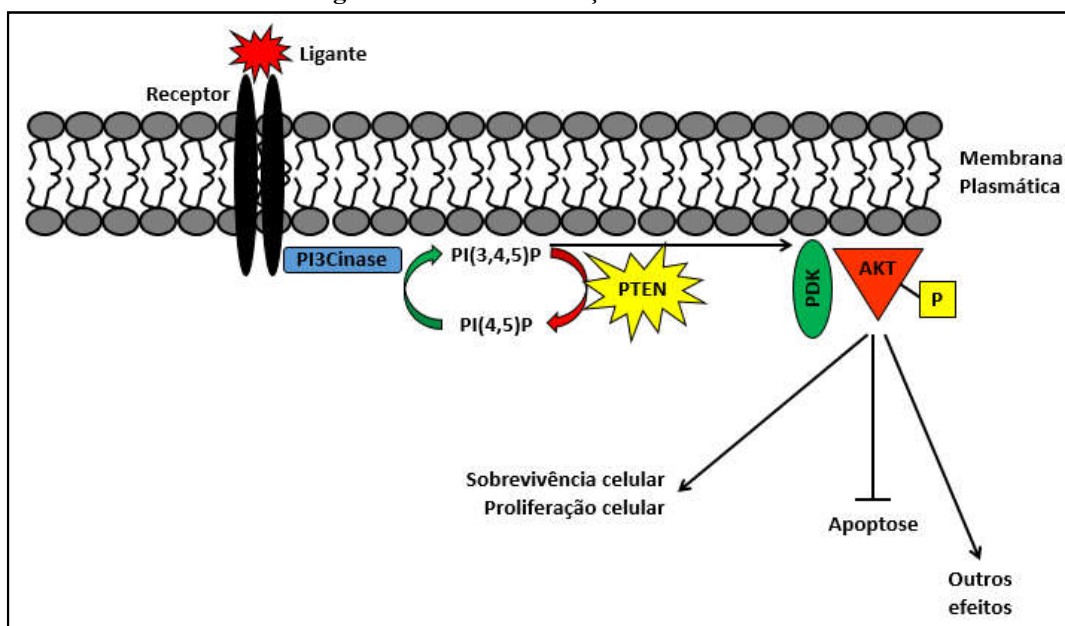
Este gene codifica a proteína PTEN, formada por 403 aminoácidos, que pertence à família das proteínas tirosino-fosfatases. A estrutura cristalizada de PTEN revela uma sequência N-terminal associada ao domínio fosfatase e uma sequência C-terminal associada ao domínio C2. A cauda C-terminal contém sítios 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). 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 hoppingenzyme, ou seja, ela solta-se facilmente tanto da membrana quanto de outras vesículas (GERICKE; MUNSON;

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

ROSS, 2006), atuando como supressor tumoral ao desfosforilar o fosfatidilinositol 3-4-5-trifosfato (PIP3) em fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP2). Desta forma, PTEN antagoniza diretamente a atividade da PI3K, provocando a diminuição dos níveis de PIP3 e o aumento de PIP2, inibindo a atividade de AKT, uma proteína cinase serina/treonina, que é a chave em múltiplos processos celulares, tais como metabolismo da glicose, apoptose, proliferação e migração celular. Quando PTEN bloqueia a ativação de AKT, ela atua de forma a inibir a migração, a invasão e a progressão do ciclo celular (Figura 2) (GIUDICE; SQUARIZE, 2013; PLANCHON; WAITE; ENG, 2008).

Figura 2 -Via de sinalização PI3K/AKT/PTEN.



Fonte: Adaptado de Planchon; Waite e Eng(2008).

Nota: A ativação do receptor pelo ligante promove a fosforilação da fosfatidilinositol, transformando o PI2P em PI3P. O PI3P irá fosforilar a proteína AKT, ativando-a. O resultado desta ativação é a sobrevivência e proliferação celular, bloqueio da apoptose, além de outros efeitos intracelulares. PI2P = fosfatidilinositol 4-5 bifosfato; PI3P = fosfatidilinositol 3-4-5-trifosfato.

A PI3K pertence a uma família de cinases lipídicas intracelulares que fosforilam o grupo 3'-hidroxil do fosfatidilinositol. De acordo com suas características estruturais, as proteínas PI3K são divididas em classe I, classe II e classe III. É uma proteína composta de uma subunidade catalítica, denominada p110, e uma subunidade regulatória, denominada p85. Os produtos lipídicos da 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 de fatores de crescimento, via receptor Tirosino-Cinase, ou por meio da ativação de RAS. A ligação da subunidade 85 kDa com o receptor

conduz a subunidade catalítica 110 kDa de PI3K para próximo da membrana, a qual irá catalisar a fosforilação dos fosfoinosítídeos, produzindo PI3P a partir de PI2P (CIDADO; PARK, 2012). A via PI3K está envolvida no controle de funções celulares e propriedades fundamentais, incluindo o crescimento celular, a proliferação, a diferenciação, a sobrevivência, o metabolismo, o tráfego vesicular, o rearranjo do citoesqueleto e a motilidade (CANTLEY, 2002; KATSO *et al.*, 2001).

A proteína HRAS², uma isoforma da proteína RAS, também ativa as isoformas PI3K Classe I (CHANG *et al.*, 2003). HRAS é frequentemente mutado em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, especialmente em tumores de pacientes asiáticos (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.

Aproximadamente 30,5% dos casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço apresentam uma elevada frequência de mutações da via PI3K (STRANSKY *et al.*, 2011). Outras vias, além da PI3K, também podem estar mutadas, tais como a via *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK). Tais mutações podem resultar em uma má resposta à quimioterapia, uma vez que 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 rapamycin*), sugerindo que esses inibidores da via podem ser utilizados como um tratamento quimioterápico (JANKU *et al.*, 2011; LUI *et al.*, 2013).

O PIP3 é um mediador lipídico que também possui a função de recrutar para a membrana celular as proteínas AKT e *Pyruvate dehydrogenase kinase* (PDK). Uma vez na membrana, a fosforilação dessas proteínas promove sua ativação (CIDADO; PARK, 2012). Nesse contexto, PTEN possui ação fosfatase que antagoniza a ação da PI3K, funcionando como um regulador negativo por ubiquitinar a via de transdução de sinal, regulando o crescimento, a proliferação e a sobrevivência celular (CHOW; BAKER, 2006; PLANCHON; WAITE; ENG, 2008).

AKT é uma família de genes (AKT1, AKT2 e AKT3) expressos na maioria dos tecidos do corpo. Estes genes codificam as proteínas 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 de uma maneira dependente da PI3K (HERS; VICENT; TAVARÉ, 2011). A ativação de AKT ocorre em lesões pré-malignas e em fase tardia de carcinomas de cabeça e

² Derivado do inglês: *RAt Sarcoma virus*.

pescoço, estando relacionada com seu prognóstico clínico (YU *et al.*, 2007). A superexpressão de AKT1 resulta em lesões orais em virtude da senescência e/ou silenciamento de p53 que permite a progressão maligna (MORAL *et al.*, 2009).

A proteína PTEN apresenta aproximadamente 47.000 Daltons, entra no núcleo tanto por difusão passiva quanto pela ligação com a MVP (Major Vault Protein) (PLANCHON; WAITE; ENG, 2008). A localização desta proteína é predominantemente citoplasmática, mas em culturas de células observa-se a presença da mesma intranuclear. Apesar do mecanismo de entrada de PTEN no compartimento nuclear ainda ser controverso, dentro do núcleo esta tem a função de manter a estabilidade cromossômica através da checagem do ciclo celular, protegendo as células de danos oxidativos (MING; HE, 2012). A atividade desta proteína no núcleo resulta em regulação negativa por desfosforilação de MAPK e ciclina D1, que induz a parada da multiplicação celular em G0/G1. Este evento produz a diminuição do crescimento tumoral, demonstrando a função supressora de tumor. Assim, o equilíbrio entre o PTEN citoplasmático e nuclear é importante para a estabilidade celular, uma vez que esta proteína no citoplasma pode estar relacionada com a inibição da via PI3K/AKT, enquanto que no núcleo ela promove 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 (Quadro 2). (PLANCHON; WAITE; ENG, 2008).

Quadro 2 - Funções da proteína PTEN intranuclear

↑ PTEN intranuclear	→	Desfosforilação MAPK e Ciclina D1	→	Parada do ciclo celular (G0/G1)
↓ PTEN intranuclear	→	↑Caspase 3/7	→	Apoptose

Fonte:Planchon; Waite e Eng (2008).

A interação entre PTEN e p53 ocorre por acetilação mediada pela enzima acetiltransferase chamada p300/CBP, que promove uma mudança conformacional de p53 formando um tetrâmero que permite a interação entre PTEN e p53. Essa interação é importante para a manutenção da acetilação de p53 em resposta ao dano no DNA e encontra-se significativamente aumentada após tratamento com radiação ionizante e radiação ultravioleta. (LI *et al.*, 2006). A perda funcional de p53 tem sido demonstrada em muitos tumores e desempenha um papel crítico na transformação maligna (HOLLSTEIN *et al.*, 1991).

Alterações de p53 estão presentes precocemente nas lesões pré-malignas como displasias da cavidade oral e a prevalência destas mutações aumentam 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 que ocorram checagem e reparo do dano. Caso o reparo do DNA não seja bem-sucedido, a proteína p53 desencadeia a senescência ou apoptose (HAUPT *et al.*, 2003). No entanto, as células que albergam mutações desta proteína não irão sofrer checagem do ciclo celular, apoptose ou senescência.

Células deficientes da proteína p53 podem replicar a presença do DNA danificado e o acúmulo de mutações genéticas adicionais, levando a divisão de células não reparadas e a formação e progressão de tumores (Quadro 3). Em OSCC as mutações no gene *TP53* estão associadas com a resposta limitada ao tratamento cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico e, conseqüentemente, morte. Arranjos de TP53 por mutação, deleção ou outros mecanismos de inativação foram encontrados em 95% dos tumores de carcinoma de células escamosas oral refratários à radiação. Observam-se riscos de recorrência loco-regional e morte após uma terapia de radiação primário ou pós-operatório significativamente maior em pacientes com mutações em TP53 (GANLY *et al.*, 2000; SKINNER *et al.*, 2011; TAN; MYERS; AGRAWAL, 2013).

Quadro 3 - Funções da proteína p53 e as conseqüências de alterações de seu nível no núcleo.

Níveis normais de p53	→	Bloqueio do ciclo celular	<ul style="list-style-type: none"> • Reparo do DNA danificado; • Senescência celular; • Apoptose.
Baixos níveis / ausência de p53	→	Replicação e acúmulo de células com danos no DNA	<ul style="list-style-type: none"> • Formação e progressão de tumores

Fonte: Haupt *et al.* (2003); Hollstein *et al.* (1991).

PTEN está relacionada, também ao controle da estabilidade da proteína p53 ao antagonizar a via Akt-Mdm2. Quando a proteína Akt está ativada ela fosforila a Mdm2 (murine double minute 2), uma ubiquitina-ligase. Essa fosforilação promove a translocação de Mdm2 do citoplasma para o núcleo, contribuindo para a degradação da proteína p53. Assim, a proteína Akt age indiretamente na regulação de p53 (MAYO; DONNER, 2002; OGAWARA *et al.*, 2002).

1.6 PTEN em Carcinoma Epidermóide Bucal

Durante a transformação maligna, o epitélio normal adjacente ao tumor expressa PTEN em maior quantidade. Aparentemente essa expressão aumentada de PTEN nessas células aparece ser uma resposta protetora inicial a este processo. Assim, a maioria dos pacientes com tumores de boca expressa moderada quantidade da proteína PTEN nos tecidos normais adjacentes ao tumor, contudo, a proteína não está expressa na camada basal de lesões potencialmente malignas. 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 OSCC, pois a expressão diminuída de PTEN em pacientes com doença linfonodal metastática avançada tem sobrevida curta e prognóstico reservado (Quadro 4) (LEE *et al.*, 2001; MOLINOLO *et al.*, 2007; SQUARIZE *et al.*, 2013).

Quadro 4 - Relação da expressão da PTEN em OSCC.

Mecanismo avaliado	Expressão de PTEN	Finalidade / Consequência
Transformação maligna do epitélio	Expressão aumentada de PTEN	<ul style="list-style-type: none"> • Resposta protetora inicial ao processo de transformação maligna.
Lesões potencialmente malignas, displasias e carcinomas epidermóides invasivos de cavidade oral	Ausência e/ou baixa expressão de PTEN	<ul style="list-style-type: none"> • Invasão epitelial no estroma circundante • Disseminação linfática linfonodal do OSCC • Sobrevida curta; • Prognóstico reservado.

Fonte: 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. Essa mutação não é um evento iniciador de CEB, mas sim um evento tardio (SQUARIZE; CASTILHO; PINTO JÚNIOR, 2002). Contudo, estudo experimental em ratos demonstraram que a ativação da via PI3K/Akt devido à supressão de PTEN acontece nas fases iniciais da formação do tumor (BIAN *et al.*, 2012). Assim, a deleção de PTEN e de TGF- β , em combinação com a perda adicional de fator receptor de TGF- β Tipo 1 (TGFBR1 - que é inibidor de proliferação epitelial), resulta em células com potencial de malignidade que podem progredir para o carcinoma através da perda da senescência e expansão de células-

tronco epiteliais. A diminuição de TGFBR1 também pode concorrer pela ativação da via do *Factor Nuclear Kappa B* (NF- κ B), - que culmina com o aumento da produção de quimiocinas no estroma tumoral resultando em um incremento da inflamação, angiogênese e imunossupressão, fatores influenciadores da aquisição do fenótipo maligno (Quadro 5).

Quadro 5 - Consequências da ativação das vias PI3K/Akt e NF- κ B na ausência de PTEN.

Via PI3K/Akt	Via NF- κ B
Crescimento celular desordenado ↓ Formação de tumor (fase inicial)	↓ TGFBR1 ↓ ↑ Produção de quimiocinas (estroma tumoral) ↓ Fenótipo Maligno (inflamação, angiogênese, imunossupressão)

Fonte: Bianet *et al.* (2012).

Hall *et al.* (2013), produziu CEB em cobaias a fim de testar novas drogas que possam prevenir ou tratar o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Eles encontraram deleção dos dois genes supressores de tumor no epitélio da boca: TGF β R1 e PTEN, que promove o desenvolvimento do carcinoma epidermóide bucal com penetrância de 100%. Dentre as alterações bioquímicas encontradas em OSCC em humanos, destacam-se o aumento da expressão de citocinas inflamatórias que promovem a proliferação e o crescimento do tumor.

Lee *et al.* (2001) analisaram 41 pacientes com OSCC invasivo de língua e a perda de expressão de PTEN ocorreu em 41% dos pacientes. Neste estudo, a análise do tempo de sobrevida dos pacientes revelou uma correlação significativa entre a perda de expressão de PTEN e o tempo de sobrevida global ($p = 0.03$) e a 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 como ferramenta de intervenção no tratamento do carcinoma epidermóide da língua.

Estudo com 60 pacientes conduzido por Rahmani *et al.* (2012) mostrou que a perda de expressão de PTEN em amostras clínicas de CEB foi significativamente relacionada com a expressão aumentada de *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), uma proteína que regula a apoptose, inibindo as células da morte celular programada. O estudo também mostrou que a perda de expressão de PTEN, somada a expressão aumentada de Bcl-2 está significativamente correlacionada com o estadiamento do câncer de boca. 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 Bcl-2 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 TSA, que inibe a enzima HDAC em culturas de células de CEB. Eles demonstraram que o TSA produz inibição do crescimento celular e a apoptose de células de CEB através da ativação de PTEN e inativação de Akt, considerando que tais drogas podem ser potenciais fármacos anti-cancerígenos na quimioterapia do CEB.

Burgucuet *al.* (2012) analisaram a expressão do TBX3 e PTEN em CEB. Os genes T-BOX, uma família de genes que codificam as proteínas Tbx (Tbx2, Tbx3, Tbx4 e Tbx5) que são fatores de transcrição importantes na proliferação e desenvolvimento celular. A expressão aumentada de TBX3 provoca diminuição da expressão de PTEN em pacientes com CEB, dando a célula neoplásica a capacidade de sobreviver ao controle da apoptose e o ganho da capacidade de metastatizar para diferentes órgãos a distância causando progressão do câncer.

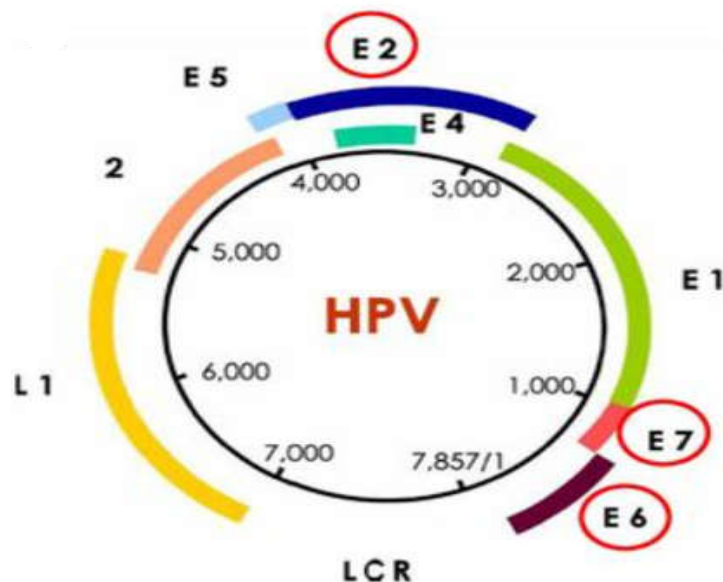
Wonet *al.* (2012) publicaram um estudo de caso-controle que comparou a frequência da mutação de PTEN em 121 pacientes com CEB e orofaringe, relacionados ou não com a presença de HPV. Eles encontraram maior frequência de mutações do PTEN em CEB/HPV negativos, apresentando pior prognóstico. Já na orofaringe esses pacientes apresentaram menor frequência de mutação de PTEN e maior frequência de HPV positivos, com melhor prognóstico.

1.7 Papilomavírus Humano (HPV)

O HPV é um vírus da família Papillomaviridae, grupo de pequenos vírus não envelopados, epiteliotrópicos, de simetria icosaédrica. O virion do HPV tem cerca de 55 nm de diâmetro e apresenta genoma de DNA dupla fita circular, com cerca de 8.000 pares de bases (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013). O genoma do HPV possui cerca de oito genes funcionalmente divididos em três regiões: região inicial, composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6, E7, que é responsável pela codificação das proteínas necessárias para replicação viral e sua transcrição; região tardia, composta pelos genes L1 e L2, que codifica as proteínas estruturais do capsídeo; região reguladora, *upstreamregulatoryregion* (URR), que apresenta elementos necessários para a replicação do DNA viral e regulação da transcrição (Figura

3)(BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013; FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI *et al.*, 2012; MUÑOZ *et al.*, 2006).

Figura 3 - Esquema representativo do genoma do HPV constituído por DNA dupla fita circular (8kb) formado por região inicial (E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7), região tardia (L1 e 2) e região regulatória(LCR).



Fonte: Adaptado de Muñoz *et al.*, (2006).

Alguns destes genes, concretamente os genes E6 e E7, foram classificados como oncogenes pela sua capacidade de induzir a transformação maligna das células infectadas, pois, E6 e E7 codificam oncoproteínas que têm como alvo as proteínas p53 e Rb, respectivamente, que são proteínas supressoras tumorais. Enquanto o Rb impede a célula de prosseguir a divisão celular ao bloquear o fator de transcrição E2F, a p53 tem o mesmo efeito ao aumentar a expressão de p21, além de desencadear a apoptose em casos de danos extensos ao DNA. Deste modo, os genes E6 e E7 do HPV acabam por induzir a divisão celular e evitar a apoptose (LJUBOJEVIC; SKERLEV, 2014).

Cerca de 18 tipos de HPV são classificados como de alto risco oncogênico: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 41, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 (MUÑOZ *et al.*, 2006). Eles estão relacionados ao desenvolvimento de tumores, como câncer de colo do útero (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012; SIMONATO; MIYAHARA, 2007; SHENG *et al.*, 2013; SKINNER *et al.*, 2014), trato ano-genital (KAMINAGAKURA *et al.*, 2012; MARUR *et al.*, 2010; ZARAVINOS, 2014) e orofaringe (CHATURVEDI *et al.*, 2013; LÓPEZ *et al.*, 2014; MUÑOZ *et al.*, 2006). Sendo assim, os fatores envolvidos na carcinogênese estão

relacionados à afinidade do HPV às células epiteliais e ao seu potencial oncogênico (MARTÍN-HERNÁN *et al.*, 2013).

1.8 HPV em Carcinoma Epidermoide Bucal

Os 18 tipos de HPV oncogênicos citados anteriormente estão relacionados ao desenvolvimento de tumores, como câncer de colo do útero (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012; SHENG *et al.*, 2013; SIMONATO; MIYAHARA, 2007; SKINNER *et al.*, 2014), trato ano-genital (KAMINAGAKURA *et al.*, 2012; MARUR *et al.*, 2010; ZARAVINOS, 2014) e orofaringe (CHATURVEDI *et al.*, 2013; LÓPEZ *et al.*, 2014; MUÑOZ *et al.*, 2006). Ultimamente, a sua associação com neoplasias benignas e malignas da cavidade oral, principalmente o carcinoma epidermóide, tem sido mais evidente.

Dos mais de 100 tipos de HPV identificados, 24 já foram localizados na cavidade oral. Destes, 4 são particularmente importantes: os tipos 6 e 11 - que estão envolvidos nas lesões benignas do epitélio oral; os tipos 16 e 18 - comprovadamente carcinogênicos e possivelmente envolvidos na etiologia de determinados carcinomas epidermóides orais. Como descrito anteriormente, a ação desses dois últimos tipos de HPV está principalmente associada às oncoproteínas E6 e E7 produzidas pelos mesmos. E6 liga-se, sequestra e degrada a p53, importante proteína supressora de tumor. E7 liga-se e sequestra a pRb, também supressora de tumor, facilitando a liberação do fator de transcrição E2F. Deste modo, em determinados carcinomas epidermóide o HPV possui uma ação sinérgica com outros carcinógenos químicos e físicos, tais como o fumo e o álcool (MELO *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Estudar a expressão de p16INK4A enquanto marcador prognóstico, a heterozigosidade e a expressão do gene PTEN em Carcinoma Epidermoide Bucal (CEB) relacionando presença e ausência casos de papilomavirus humano.

2.2 Específicos

- Avaliar a expressão de p16INK4A em amostras de Carcinoma Epidermoide Bucal;
- Avaliar a perda adicional de heterozigose do gene PTEN e seu nível de expressão de proteínas no CEB;
- Relacionar os achados das análises da expressão da proteína PTEN e p16 com a sobrevida dos pacientes e com casos positivos de papilomavirus humano.

CAPÍTULO I

*SIGNIFICANCE OF P16INK4A EXPRESSION AND PTEN LOSS OF HETEROZYGOSITY
IN HUMAN PAPILLOMA VIRUS-RELATED ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA*

ANTICANCER RESEARCH

Significance of *P16^{INK4A}* Expression and *PTEN* Loss of Heterozygosity in Human Papilloma Virus-related Oral Squamous Cell Carcinoma

VALDENIRA DE JESUS OLIVEIRA KATO^{1,2*}, MICHELLE CARVALHO DE ABREU^{3,4*},
ALBERTO MITSUYUKI DE BRITO KATO^{5,6}, LUCAS LACERDA DE SOUZA^{4,7},
FLAVIA SIROTHEAU CORREA PONTES⁷, CARLA DE CASTRO SANT'ANNA^{2,3},
ARNALDO GONÇALVES JUNIOR⁷, HÉLDER ANTÔNIO REBELO PONTES^{4,7},
ANDRE SALIM KHAYAT³ and ROMMEL MARIO RODRIGUEZ BURBANO^{2,3}

¹Laboratory of Human Cytogenetics, Federal University of Pará, Belém, Brazil;

²Laboratory of Molecular Biology, Ophir Loyola Hospital, Belém, Brazil;

³Oncology Research Center, João de Barros Barreto University Hospital, Federal University of Pará, Belém, Brazil;

⁴Oral Diagnosis Department (Pathology and Semiology Areas), Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, Brazil;

⁵Head and Neck Surgery Department, Ophir Loyola Hospital, Belém, Brazil;

⁶Head and Neck Surgery Department, João de Barros Barreto University Hospital, Federal University of Pará, Belém, Brazil;

⁷Oral Surgery and Pathology Department, João de Barros Barreto University Hospital, Federal University of Pará, Belém, Brazil

Abstract. Background/Aim: *p16* and *PTEN* are tumor suppressor genes. Loss of these molecules in oral squamous cell carcinoma (OSCC) has been studied worldwide. In this study, we explored whether *p16* cooperates with inactive *PTEN* during the pathogenesis of OSCC, especially in regard to tumor aggressiveness and proliferation. Materials and Methods: Immunocytochemistry and western blot analysis were used to examine the levels of *p16* and *PTEN*. Sequencing analysis was performed to identify mutations in the *PTEN* gene and HPV infection. Fluorescence in situ hybridization was used to examine the presence of the *PTEN* locus. Results: *PTEN* analysis showed high positivity in T4 samples. HPV-positive tumors correlated with tabagism, tumor size 3 and 4, disease stages 3 and 4, presence of lymph node metastasis (N1) and poor differentiation. Immunoexpression of *p16* was strongly correlated with the presence of HPV. Conclusion: *PTEN* demonstrated a higher reactivity in advanced disease stages and *p16* was strongly

associated with HPV. Viral presence decreases tumor aggressiveness. Patients with advanced stage lesions demonstrated lower survival rate.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a subgroup of head and neck cancer squamous cell carcinoma (HNSCC), and the sixth most common malignancy in the world. Despite achievements in the prevention, diagnosis, and treatment management in the last three decades, it still has a weak 50% overall 5-year survival rate (1-3). Despite the well-described synergistic interaction between heavy tobacco and alcohol consumption as significant risk factors, in the last decades, epidemiological studies have shown an essential role for high-risk human papillomavirus (HPV) infections in a subset of HNSCCs, predominantly in oropharynx tumorigenesis (4-7).

HPV-positive head and neck tumors, mainly in the oropharynx, have inherently different epidemiological, clinical, and molecular characteristics compared to those caused by classic risk factors and their HPV-negative counterparts. Noteworthy, the global impact of HPV-associated OSCC cases and the distinct molecular mechanisms that play a significant role in HPV-positive and HPV-negative tumor progression are still unclear (8-10). Oral carcinogenesis is a complex process characterized by aberrant gene and protein expression. In this context, the investigation of *p16* expression changes and the *PTEN* gene status has gained prominence (11, 12).

Correspondence to: Carla de Castro Sant' Anna, Núcleo de Pesquisa em Oncologia, Mundurucus Street, 4487, 66073-000 Guamá, Belém, PA, Brazil. Tel: +55 91980118880, e-mail: santannacarla@yahoo.com.br

Key Words: Head and neck, HPV, *p16*, *PTEN*, oral squamous cell carcinoma.

p16 overexpression has been recognized as a reliable surrogate marker for oncogenic HPV infection (13, 14). This protein binds to CDK4 or 6 to impair complex formation with cyclins, which in turn is responsible for the phosphorylation and consequent inactivation of pRB, resulting in cell cycle arrest at G₁/S checkpoint, a way through which p16 protein can inhibit cancer cell proliferation (8, 15).

PTEN is a well-established tumor suppressor gene and a negative regulator of the PI3K/Akt/mTOR pathway; loss of PTEN results in Akt hyperactivation (16, 17). Importantly, loss of PTEN expression was found in 29% of tongue cancers, and loss of heterozygosity (LOH) was identified in 40% of HNSCCs, which has been related to worse outcomes after adjuvant radiotherapy (18-20).

Based on the above, this study aimed to provide an initial insight into p16^{INK2a} expression as a potential prognostic marker, as well as the relevance of additional LOH of the PTEN gene and its protein expression levels in OSCC in a Northern Brazilian cohort.

Materials and Methods

Study design. This retrospective study included a cohort of 119 patients diagnosed with primary OSCC at the Oral Pathology Department of João de Barros Barreto University Hospital (Belém, Brazil) (Table I). The study was conducted following the principles of the Declaration of Helsinki, and the Ethics Committee approved the protocol of the University Hospital João de Barros Barreto (n° 1.426.757). Two oral pathologists and one head and neck surgeon analyzed the available samples to define the TNM classification according to the American Society of Clinical Oncology classification (21).

Immunohistochemistry (IHC). The reactions were carried out in 3 µm thick histological sections, dewaxed in two xylol baths, the first in an oven at 60°C and the second at room temperature. Then, the sections were hydrated in a descending series of ethanol (100%, 95% and 85%). To remove the formolic pigment, the sections were dipped in 10% ammonium hydroxide and 95% ethanol and washed with distilled water. To uncover antibody epitopes, the sections were immersed in 10 mM EDTA buffer solution (pH 8.0), incubated in a microwave for 15 min, and then washed in distilled water. To block endogenous peroxidase, the sections were dipped in a solution of 6% hydrogen peroxide and methanol (1: 1, v/v) twice for 15 min at room temperature and then, washed with Tris solution (pH 7, 4). Then, 3 µm thick histological sections were incubated with antibodies against PTEN (polyclonal anti-human PTEN, Invitrogen, Waltham, MA, USA) and p16 (monoclonal anti-human p16, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). After rinsing with PBS, slides were incubated with secondary antibody followed by streptavidin-biotin-peroxidase complex, both for 30 min at room temperature with a PBS wash between each step (LSAB-Kit + HRP; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). After diaminobenzidine (DAB+; Agilent Technologies) visualization of peroxidase activity, sections were subsequently counterstained with Mayer's hematoxylin solution (Merck, Darmstadt, Germany). Two pathologists classified the results according to Tsurutani and colleagues (22).

Table I. *Clinicopathological characteristics of the analyzed samples.*

Clinicopathological features	
N=119	N (%)
Age	
≤40 years	12 (10%)
>40 years	107 (90%)
Gender	
Female	52 (43.7%)
Male	67 (56.3%)
Smoking	
No	45 (37.8%)
Yes	74 (62.2%)
Primary tumor site	
Tongue/Floor of the mouth	65 (54.6%)
Other locations	54 (45.4%)
T (Tumor size)	
T1 or T2	47 (39.5%)
T3 or T4	72 (60.5%)
N (Lymph node metastasis)	
N0 or N1	78 (65.5%)
N2 or N3	41 (34.5%)
Disease stage	
I or II	41 (34.5%)
III or IV	78 (65.5%)
Mutational evaluation	
Mutated	23 (19.3%)
Non-mutated	96 (80.7%)
Histological grade	
Poorly differentiated	56 (47%)
Moderate	29 (24.4%)
Well differentiated	34 (28.6%)

Fluorescence in situ hybridization (FISH). The FISH assay was carried out using 5 µl of Vysis LSI PTEN SpectrumOrange Probe (Abbott Molecular Inc. Chicago, IL, USA) in a humidified chamber at 37°C overnight and the slides were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride). For FISH evaluation, 200 randomly chosen cells stained with the probe in each allele of the *PTEN* gene per sample were counted. Signals of homozygous *PTEN* deletion were considered when a simultaneous lack of both *PTEN* locus signals in 25%-30% of the analyzed cells' scored nuclei was observed (23-25).

Western blotting analysis. Fifty protein samples from human mouth lining epithelium were extracted using RIPA lysis and extraction buffer (25 mM Tris•HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), solubilized in 4X Laemmli sample buffer and denatured for 5 min at 95°C. The proteins were separated by electrophoresis on 12% or 15% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (GE Healthcare Chicago, Illinois, USA). PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA, USA) were then blocked at 4°C overnight with 5% non-fat dry milk in PBS containing 0.1% Tween 20. Then, the membranes were incubated with an antibody against p16 (dilution 1:1000; Thermo

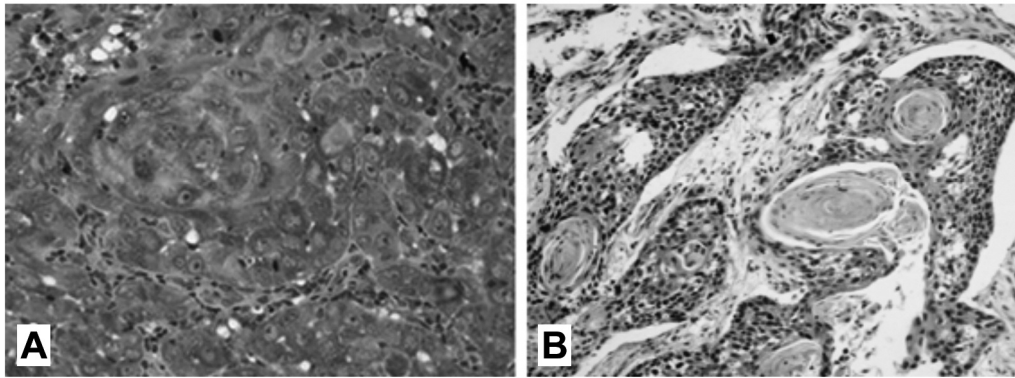


Figure 1. Immunohistochemical analysis of *PTEN* and *p16* protein expression in OSCC. (A) Immunoreaction for *PTEN* protein was predominantly in the cytoplasm, less frequent in the nucleus (DAB, $\times 40$). (B) Immunolabeling for *p16* demonstrating a nucleus pattern (DAB, $\times 20$).

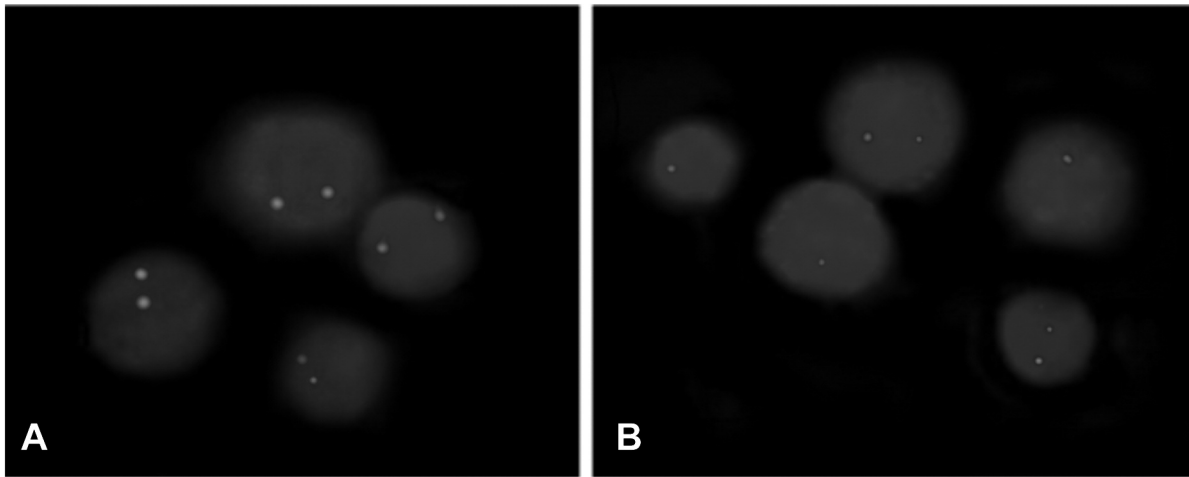


Figure 2. Immunofluorescence for *PTEN* evaluating the loss of alleles. (A) Two signals, homozygosity. (B) Loss of homozygosity, one signal.

Fisher Scientific). The antigen-antibody complexes were visualized using an HRP-conjugated secondary antibody and an enhanced chemiluminescence system (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific). Acquired images were quantified by ImageQuant 350 digital image system (GE) and β -Actin (1:200, Abcam, Cambridge, UK) was used as an internal control of the experiments.

DNA isolation and molecular analysis of *PTEN*. Ten 5- μ m thick histological sections were obtained for DNA extraction by the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands), following the protocol of the manufacturer. *PTEN* gene exons 1-9 (26-28) were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and samples were then purified with Sephadex® G-50 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Subsequently, the sequencing reactions were performed using the BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems 3500, Darmstadt, Germany). Sequencing of non-tumor DNA (from normal mucosa) was used to ascertain that *PTEN* mutations found

in the tumors were somatic. Independent repeated analyses confirmed the mutations.

HPV analysis by direct sequencing. The efficacy of DNA extraction was evaluated by PCR amplification of the β -globin gene (29). For the HPV PCR detection, viral gene-specific reactions were performed using GP5+ and GP6+ primers, which amplify a 150 bp fragment of the L1 viral gene, corresponding to a conserved region of the virus genome (30). The viral identification was performed by direct sequencing of the PCR product using the 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

Statistical analyses. Data were analyzed statistically using the GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and PASW Statistics program 18.0 (Quarry Bay, Hong Kong). Associations between HPV and other clinicopathological features were analyzed using chi-square (χ^2) and logistic regression. Overall survival rates were estimated by the Kaplan–Meier method and

Table II. Somatic origin of mutations.

Case	Mutational status ^A	Protein change ^B	Exon	Consequence	1	2
9	c.253+1 G>C	Splice site	4	Frameshift	8.0%	92.0%
11	c.386 G>A	G129E	5	Missense	7.5%	92.5%
16	c.697 C>T	R233X	7	Nonsense	3.5%	96.5%
26	exon 6-9 del	-	-	Deletion	5.0%	95.0%
28	exon 2 del	-	-	Deletion	2.0%	98.0%
30	c.388 C>T	R130X	5	Nonsense	37.5%	62.5%
32	c.1003 C>T	R335X	8	Nonsense	12.5%	87.5%
33	c.368 A>G	H123R	5	Missense	8.0%	92.0%
36	c.359 T>G	A120X	5	Nonsense	8.0%	92.0%
56	c.253+1 G>C	Splice site	4	Frameshift	36.0%	64.0%
61	c.253+1 G>C	Splice site	4	Frameshift	25.5%	74.5%
65	c.395 G>A	G132N	5	Missense	18.0%	82.0%
70	c.406 T>C	C136R	5	Missense	39.5%	60.5%
73	c.406 T>C	C136R	5	Missense	29.5%	70.5%
76	c.389 G>A	R130Q	5	Missense	10.0%	90.0%
82	c.253+1 G>C	Splice site	4	Frameshift	25.0%	75.0%
83	c.388 C>T	R130X	5	Nonsense	40.0%	60.0%
86	c.528 T>C	Y176X	6	Nonsense	5.0%	95.0%
88	c.388 C>T	R130X	5	Nonsense	8.5%	91.5%
98	c.209 T>C	L70P	3	Missense	18.0%	82.0%
99	c.388 C>T	R130X	5	Nonsense	35.0%	65.0%
106	c.388 C>T	R130X	5	Nonsense	40.0%	60.0%
119	c.253+1 G>C	Splice site	4	Frameshift	50.5%	49.5%

^ANumbering of the bases indicating the alteration is given relative to the cDNA sequence, with the initiator ATG beginning at base 1. ^BThe original amino acid and position of the residues in the protein (with the initiator Met numbered as 1) are followed by an "X" in the case of nonsense mutations.

compared using a Log-rank test. The level of significance was based on a *p*-value ≤ 0.05 , and the confidence interval was 95%.

Results

PTEN immunohistochemistry. PTEN was positive in 79 cases (66.4%), and negative in 40 cases (33.6%). The immunoreaction of PTEN protein was predominantly in the cytoplasm (72.3%), less frequent in the nucleus (5%) and concomitantly in the cytoplasm/nucleus (22.7%). Stage IV tumors showed a higher cytoplasmic/nuclear (51, 9%) immunolabeling (*p*=0.002) (Figure 1).

High positivity of PTEN was observed in T4 tumors (46.8%) when compared to T1 (22.8%), T2 (11.4%) and T3 (19%) tumors (*p*<0.01). Patients who presented lymph node metastasis showed a higher PTEN positive index when compared to those who did not present lymph node metastasis (55% vs. 44.6%, *p*=0.02). In contrast, there was no statistically significant correlation between PTEN positivity and age at diagnosis (*p*=0.98), gender (*p*=0.16), primary tumor site (*p*=0.21), disease stage (*p*=0.61), mutation (*p*=0.17), histological grade (*p*=0.57) and p16 expression (*p*=0.74).

Positive PTEN protein expression was significantly increased in smoking patients when compared to the non-smoking group. Smoking patients had 2.5 times higher expression of PTEN than

non-smoking patients (95%CI=1.156-5.549; *p*=0.03). Our results demonstrated a significant result when the disease stage was associated with mutation, showing that stage IV (65.2%) presented a higher number of mutated cases when compared with stage II (21.7%) and stage III (13%) (*p*=0.043).

PTEN FISH and molecular analysis. FISH detected loss of alleles in 23 tumors (19.3%), and sequencing of exons 1 to 9 of *PTEN* gene revealed point mutations in 16 samples. We considered that the *PTEN* allele was deleted when 25% or more of the cells in the FISH presented only one fluorescent signal. We were able to observe one fluorescent signal in 49-98% of the interphasic nuclei analyzed, which indicated a deletion of the *PTEN* gene in our samples (Figure 2).

Even with this high index (19.3% of the samples with more than 25% of the cells had deleted *PTEN* gene), we could not observe a significant association (*p*>0.05) between the deletion of the *PTEN* gene and any of the clinical, pathological, or genetic variables analyzed in the present study. In the other 96 OSCC samples (81, 7%), no alteration of the *PTEN* gene was observed, and the alleles losses occurred in less than 25% of nuclei. No correlation was found between the presence of *PTEN* mutations and the overall survival of the patients studied (*p*>0.05). However, when we examined the number of mutations in different

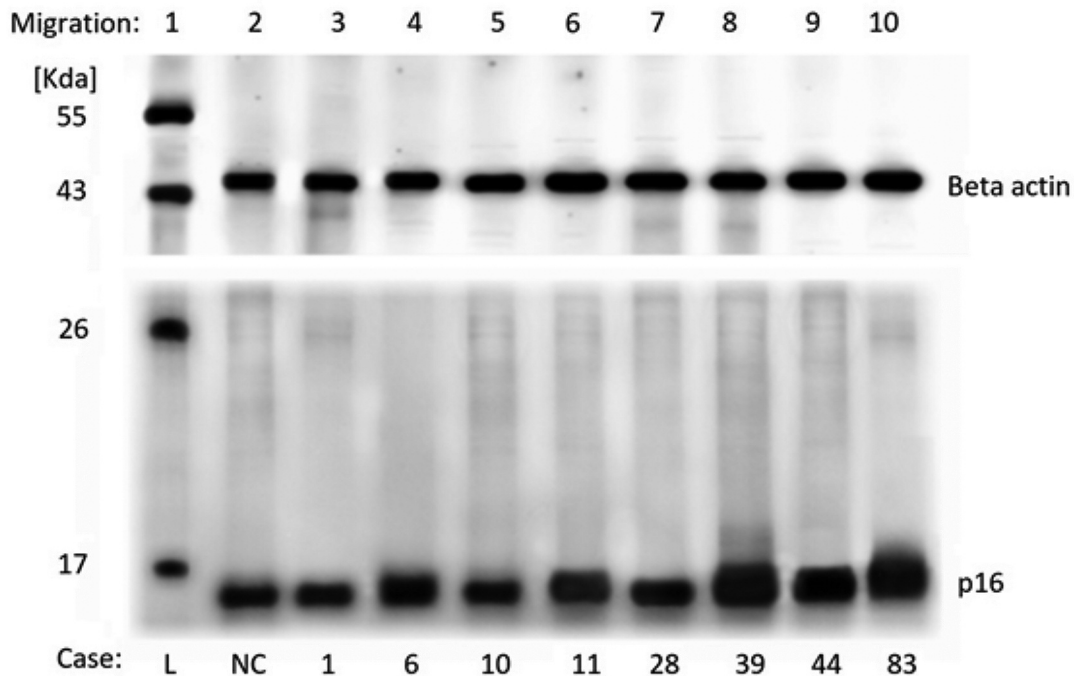


Figure 3. Representative western blot of p16 (lower gel) and beta-actin (upper gel) that was used as an endogenous marker for normalization. Lanes are labeled on the top of the figure, and the analyzed patients' case numbers are shown at the bottom. Lane 1 L=ladder band pattern. Lane 2 NC=normal control (pool of p16 proteins extracted from 55 normal human mouth lining epithelium). Lanes 3, 5, and 7 correspond to cases negative for the HPV virus that do not overexpress p16 (p16 expression similar to the normal human mouth lining epithelium). Lanes 4, 6, 8, 9 and 10 correspond to HPV-positive cases [subtype 6 (lanes 4 and 6) 16 (line 8), 11 (line 9) and 18 (line 10)] with p16 overexpression. Lanes 3 and 5 correspond to samples with wild type p16 that are negative for HPV and do not overexpress p16. Lanes 4, 8, and 9 correspond to samples with wild type p16 that are positive for HPV and overexpress p16. Lanes 6 and 10 correspond to samples with mutated p16 that are positive for HPV and overexpress p16, and lane 7 corresponds to a sample with mutated p16 that is negative for HPV virus and does not overexpress p16. The relative quantification of OSCC tumor p16 protein in relation to the pool of p16 proteins extracted from 55 normal human mouth lining epithelium was: 0.98 (lane 3), 1.58 (lane 4), 0.96 (lane 5), 1.58 (lane 6), 1.17 (lane 7), 2.01 (lane 8), 1.59 (lane 9), 2.23 (lane 10).

tumor stages, we could observe a statistically significant difference between stage IV (60% of them) and stages II (27% of them) and III (20% of them) ($p=0.043$). There is a seven times greater risk for advanced stages in the presence of mutation of *PTEN*. We did not detect mutations in stage I. The results of the molecular analyses and FISH of the *PTEN* gene are summarized in Table II.

Distribution of HPV status. In the analyzed samples, it was observed that 64 samples (53.8%) were positive for HPV, whereas 55 (46.2%) were negative for HPV. Among those positive, 15 samples demonstrated a positive reaction product for low-risk HPV-6 (23.5%), 9 for subtype 11 (14%), 25 subtype 16 (39%) and 15 subtype 18 (23.5%), totaling 40 cases with high risk for HPV(HR-HPV). HPV-positive tumors demonstrated a statistically significant result for tabagism ($p<0.0001$), evidencing an association between tobacco consumption and HPV positive samples. Furthermore, the results revealed a significant correlation between HPV-positive

status, tumor size 3 and 4 ($p<0.0001$) and disease stage 3/4 ($p<0.0001$) when compared to HPV negative samples. Additionally, we observed a strong correlation between HPV positive status and lymph node metastasis (N1) ($p<0.0001$), as well as with poorly differentiated tumor samples ($p<0.0001$).

Distribution of p16 positive cases in all tumors. p16 immunoreaction demonstrated primarily a cytoplasmic pattern (82.3%), less frequently a nuclear pattern (7.8%) and concomitantly in the cytoplasm/nucleus (9.9%) (Figure 1B).

p16 expression was strongly associated with the presence of HPV ($p<0.0001$). However, there was no statistically significant correlation between the expression of p16 and some clinicopathological features, like age ($p=0.10$), gender ($p=0.58$), TNM, and mutational status of *PTEN* ($p=0.52$). It is worth emphasizing that fifty-eight percent of patients with p16-positive tumors were non-smokers, and 85.7% of those with p16-negative tumors had more than ten pack-years of exposure.

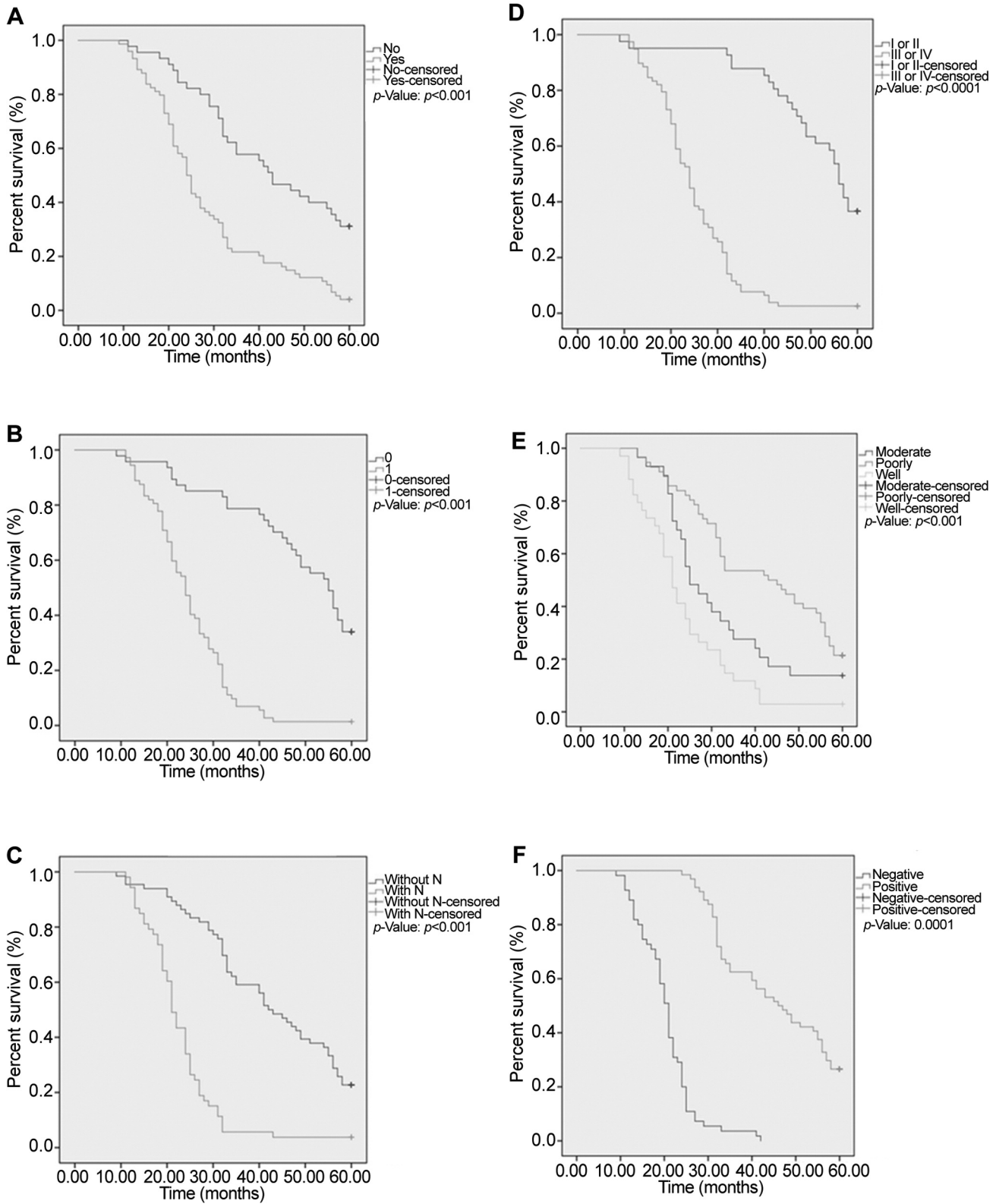


Figure 4. Continued

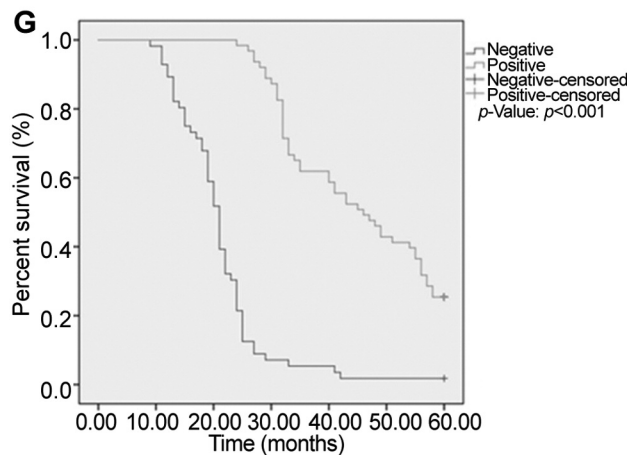


Figure 4. Survival analysis and its association with clinicopathological factors. (A) Smoking patients demonstrated 14 months less survival than non-smoking patients ($p < 0.001$). (B) Individuals who presented tumor sizes 3 and 4 demonstrated a 1.94 times higher risk of death when compared with tumor sizes 1 and 2 ($p < 0.001$). (C) Patients diagnosed with 2 or 3 metastatic lymph nodes were 2.23 times more likely to die compared to patients without lymph node metastasis or with only one lymph node metastasis ($p = 0.001$). (D) Individuals who demonstrated disease stage 3 or 4 showed 2.03 times higher risk of death than stage 1 and 2. (E) The odds of death among those who presented poorly differentiated histological grade were 1.76 times ($p < 0.001$) higher than those classified as well-differentiated tumors. (F) Individuals who had no HPV had a 2.22 times greater chance of death than that seen for HPV-positive patients ($p = 0.0001$). The odds of death among patients who were HPV-negative was 2.22 times ($p = 0.0001$) greater than that observed for HPV-positive patients. (G) Patients who were p16 negative showed 2.14 times longer survival time than those who were p16 positive ($p < 0.001$).

Figure 3 is a representative western blot of p16 that lists OSCC HPV negative cases that do not overexpress p16 (p16 expression similar to the normal human mouth lining epithelium) and OSCC HPV-positive cases with p16 overexpression.

Survival outcomes. The follow-up time was 5 years (60 months). Overall, 102 patients (85.7%) deceased. Overall cumulative survival rates were 95% at one year, 33% at three years, and 14% at five years. Univariate analysis found prognosis to be significantly related to seven clinicopathological factors. These variables were: smoking, tumor size, lymph node metastasis, disease stage, histological grade, HPV status, and subtypes. Multivariate analysis of these six significant variables determined by univariate analysis identified that all six prognostic factors independently impacted on survival and one (p16 status) that did not independently impact on survival. The log-rank test showed that the odds ratios of death among

smoking patients were 1.5 times higher, equivalent to 14 months less of survival ($p < 0.001$), than non-smoking patients (Figure 4A). Patients who presented tumor sizes 3 and 4 demonstrated a 1.94 times higher risk of death ($p < 0.001$) when compared with tumor sizes 1 and 2 (Figure 4B). The odds of death for patients who were diagnosed with lymph node metastasis 2 and 3 was 2.23 times. The risk of death was 2.23 times greater for patients with lymph node metastasis (N2 and N3) ($p < 0.001$) than patients with no lymph node metastasis (0 and 1) (Figure 4C). Regarding the disease stage, our results demonstrated that the odds of death among those who presented disease stages 3 and 4 was 2.03 times ($p < 0.0001$) greater than those staged as 1 and 2 (Figure 4D).

The odds of death among those who presented poorly differentiated histological grade were 1.76 times ($p < 0.001$) higher than those classified as well-differentiated tumors (Figure 4E). Furthermore, the odds of death among patients who were HPV-negative was 2.22 times ($p = 0.0001$) greater than those observed for HPV-positive patients (Figure 4F). We examined survival outcomes based on p16 status and observed that those patients who presented p16 positive immunostaining had 2.14 times longer survival time than those who were negative ($p < 0.001$) (Figure 4G). There were also survival outcome differences between the p16-positive and p16-negative patients that had a smoking history. The patients who were smokers and had no p16 protein expression had two times fewer survival months compared with non-smokers that were p16 positive ($p < 0.001$).

Discussion

OSCC is the most common malignant neoplasm of the oral cavity (31, 32). This pathological entity commonly affects male individuals, such as those in the present study, belonging to an age group above 40 years and is frequently diagnosed in the sixth decade of life, which is in accordance with our results (33-37). Furthermore, it has been shown that the tongue and the floor of the mouth are the lesion sites in the majority of cases (23, 31, 34, 38).

The tumor suppressor gene *PTEN* is also involved in oral tumorigenesis, as it has been demonstrated that *PTEN* inactivation or deletion mimics activation of the mTOR signaling pathway in the pathogenesis of OSCC. Moreover, *PTEN* LOH and reduced levels of the protein play an essential role in aggressive tumors and contribute to poor disease-free and overall survival (39, 40). In support, from 119 patients with OSCC analyzed in the present study, 40 samples were negative for *PTEN* immunoeexpression.

Squarize *et al.* (38) have analyzed *PTEN* expression in OSCC by immunohistochemistry. They showed that protein expression was related to the degree of malignancy and that aggressive tumors with high malignancy score did not express *PTEN*, suggesting that it can be used as a prognostic marker.

Conversely, our study demonstrated a statistically significant association between increased PTEN expression and T4 tumors, lymph node metastasis, and smoking. This unexpected result may be explained by the fact that increased PTEN levels occur to compensate for the increased levels of Akt, since they directly influence the molecular pathways of progression of malignant neoplasms (17, 23). Additionally, Troeltzsch and colleagues (41) have shown that poorly differentiated tumors are associated with the occurrence of lymph node metastasis, which corroborates with our results since an increased number of poorly differentiated tumors was observed.

Mutations in the *PTEN* gene were also evaluated in the lesions, and we observed 16 point mutations and allelic deletions in 19.3% of the analyzed tumors. The results showed a statistically significant association between stage IV tumors and the presence of a mutation.

Previous studies that evaluated gene expression and copy number alterations in OSCC demonstrated loss of *PTEN* in 59.4% of cases (42). Indeed, somatic mutations or deletions of *PTEN* have been previously described in a wide variety of premalignant and malignant lesions, including breast, prostate, endometrial, and oral squamous cell carcinomas, head and neck cancer, glioblastoma and melanoma (43). In head and neck squamous cell carcinoma, loss of the *PTEN* gene was found in 8.16% of cases, and somatic mutations in 5.45% (44). Interestingly, protein expression was not correlated with the presence of mutations, indicating that another mechanism can alter PTEN function.

Another gene with suppressor function and a significant role in carcinogenesis is *p16*, a cyclin-dependent kinase inhibitor that controls tumor progression by inhibiting transition through the G1 phase of the cell cycle (45). In this study, we examined the correlation between HR-HPV infection and *P16* and *PTEN* LOH and observed that high expression of p16 and PTEN in OSCC was sometimes associated with clinicopathological data.

Recent studies have found that abnormal expression of the tumor suppressor gene *P16* was closely associated with HR-HPV infection during carcinogenesis in a subset of HNSCC. Multiple studies have found that p16 is an important prognostic biomarker in oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) (46). The prognostic role of p16 in non-oropharyngeal HNSCC, including OSCC, however, is unclear. Several studies have concluded that p16 has no prognostic significance in non-OPSCC (14, 47, 48), whereas others have concluded the opposite (49).

HPV DNA and expression of p16 has been suggested as a gold standard marker for the detection of HPV infection in many cases of cancers (49, 50). The frequency of HPV infection is significantly higher in patients with OSCC, as identified through the detection of HPV DNA and p16 expression (51). Our results revealed that 64 of the 119 cases were HPV positive, with a high expression of p16. Among

these positive samples, 40 showed the presence of the virus subtypes 16 or 18. Interestingly, a study that evaluated the expression of p16 in correlation with an HPV infection in HNSCC observed that the protein expression was higher in the oropharynx and p16 positive patients had better survival, demonstrating that it is a useful prognostic marker in combination with the status of the p16 HPV (52).

A recent study analyzed 174 samples of OSCC for p16 levels and the presence of HPV DNA and its genotypes. Of the total, 24 samples were found to overexpress p16 and in 13, HPV DNA was detected. In agreement, the current study demonstrated that HR-HPV (16 or 18) genotypes were the most prevalent, enhancing the hypothesis about p16 immunoreactivity and HPV genotyping as a useful marker of virus infection in OSCC (53).

Several studies have examined the relationship between smoking status and p16 expression mechanisms and reported that smoking was significantly associated with promoting p16 methylation (54). Corroboratively, a recent study from China has reported that smoking is positively correlated with p16 hypermethylation in NSCLC (55). However, their meta-analysis was limited to promoter methylation, which is not the most common mechanism of inactivation for p16. Another meta-analysis confirmed that all inactivation mechanisms are genuinely associated with loss of protein expression. There is also a study that identified specific associations between p16 inactivation mechanisms and other genetic changes and smoking status (54).

Regarding patient's survival, we observed that smoking patients presented 14 months shorter survival compared to non-smoking patients. Kawakita *et al.* have explained that smoking induces p53 mutations and may trigger many harmful cascades in the human body, leading to a poor prognosis (56). Increased tumor size (3 and 4) demonstrated a 1.94 times higher risk of death when compared with smaller tumor sizes, consistent with other previous studies (41, 57). Additionally, we showed that the odds of death for patients who were diagnosed with lymph node metastasis N2 or N3 were higher (2.23 times higher) than those with N0 or N1. Furthermore, we demonstrated that the odds of death among those who presented with disease stages 3 and 4 were two times greater than those staged as 1 and 2. Therefore, cancer staging based on the TNM stage was a significant prognostic variable (58).

Positive HPV samples were also significantly correlated with increased tumor size, which can be explained by the inactivation of the Rb protein through the E7 HPV protein. In this scenario, p16 overexpression may be an attempt to recover Rb normal function, thus allowing normal cellular progression from the G1 phase to the S phase of the cell cycle. Furthermore, similar to our results, it has been shown that advanced tumors also showed a significant association with p16 overexpression (59).

In addition, the possibility of death of patients with poorly differentiated histological grades was 1.76 times greater than those with well-differentiated tumors, which is compatible with previous studies (60). The tumor's aggressiveness may explain, for instance, the association of the histological grade with lymph node metastasis, recurrence index, and distant metastasis (56, 58).

Besides that, p16 has been shown to sensitize HPV-positive cells to ionizing radiation by inhibiting homologous recombination-mediated DNA damage response and down-regulating cyclin D1 expression. The inhibition of the DNA damage response by p16 is thought to be independent of its cell-cycle regulation–inhibition CDK4/6 activity (61).

Conclusion

In conclusion, *PTEN* and *p16* are suppressor genes that control tumor progression. In the current study, *PTEN* demonstrated a higher immunoreactivity in advanced disease stages (seven more times). p16 was strongly associated with HPV and did not demonstrate a significant association with any clinicopathological factor analyzed. Both proteins present great importance for the prognosis of patients. It was demonstrated that the presence of the virus decreases tumor aggressiveness. Also, advanced stages lesions demonstrated a lower survival rate. We observed that smoking and p16 absence were significantly associated with two times decreased survival rate.

Further understanding of the role of *PTEN* in the initiation and progression of cancer increases may be used for the design of novel therapeutic approaches, such as inhibition of Akt, which the protein involved in the most common signaling pathway associated with OSCC progression.

Conflicts of Interest

The Authors declare that they have no competing interests regarding this study.

Authors' Contributions

Study concepts: RMRB, VJOK, MCA, HARP; Study design: RMRB, VJOK, MCA, HARP; Data acquisition: VJOK, MCA, LLS, ASK, AMBK; Quality control of data and algorithms: AGJ, ASK, CCS, LLS, MCA, RMRB; Data analysis and interpretation: VJOK, AMBK, AGJ, ASK, CCS, LLS, MCA, RMRB; Statistical analysis: ASK, MCA, LLS, RMRB; Manuscript preparation: VJOK, MCA, LLS, RMRB, FSCP, HARP; Manuscript editing: VJOK, MCA, AMBK, LLS, ASK, CCS, FSCP, AGJ, HARP, RMRB; Manuscript review: VJOK, MCA, AMBK, LLS, ASK, CCS, FSCP, AGJ, HARP, RMRB.

Acknowledgements

This work was supported by the Coordination of Improvement of Higher Education –Brazil (CAPES, Finance Code 001 to V.J.O.K.); National Counsel of Technological and Scientific Development -

Brazil (CNPq, grants #301350/2019-1 to R.M.R.B.) and Dean of Research and Graduate Studies of Federal University of Pará – Brazil (PROPEP for payment of the publication fees).

References

- Sasahira T and Kirita T: Hallmarks of cancer-related newly prognostic factors of oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 19(8), 2018. PMID: 30115834. DOI: 10.3390/ijms19082413
- Bavle RM, Venugopal R, Konda P, Muniswamappa S and Makarla S: Molecular classification of oral squamous cell carcinoma. *J Clin Diagn Res* 10(9): 18-21, 2016. PMID: 27790599. DOI: 10.7860/JCDR/2016/19967.8565
- Kumar M, Nanavati R, Modi TG and Dobariya C: Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther* 12(2): 458-463, 2016. PMID: 27461593. DOI: 10.4103/0973-1482.186696
- Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Applebaum KM, Nelson HH, Posner MR and Kelsev KT: Human papillomavirus 6 seropositivity is associated with risk of head and neck squamous cell carcinoma, independent of tobacco and alcohol use. *Ann Oncol* 20(3): 534-541, 2009. PMID: 19087986. DOI: 10.1093/annonc/mdn643
- Ragin CC, Modugno F and Gollin SM: The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res* 86(2): 104-114, 2007. PMID: 17251508. DOI: 10.1177/154405910708600202
- Husain N and Neyaz A: Human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma: Controversies and new concepts. *J Oral Biol Craniofac Res* 7(3): 198-205, 2017. PMID: 29124000. DOI: 10.1016/j.jobcr.2017.08.003
- Bersani C, Haegglblom L, Ursu RG, Giusca SE, Marklund L, Ramqvist T, Näsman A and Daliani T: Overexpression of FGFR3 in HPV-positive tonsillar and base of tongue cancer is correlated to outcome. *Anticancer Res* 38(8): 4683-4690, 2018. PMID: 30061236. DOI: 10.21873/anticancer.12774
- Molinolo AA, Marsh C, El Dinali M, Gangane N, Jennison K, Hewitt S, Patel V, Seiwert TY and Gutkind S: mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. *Clin Cancer Res* 18(9): 2558-2568, 2012. PMID: 22409888. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2824
- Wasylyk B, Abecassis J and Jung AC: Identification of clinically relevant HPV-related HNSCC: in p16 should we trust? *Oral Oncol* 49(10): e33-e7, 2013. PMID: 23962789. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2013.07.014
- Nauta IH, Rietbergen MM, van Bokhoven AAJD, Bloemena E, Lissenberg-Witte BI, Heideman DAM, Baatenburg de Jong RJ, Brakenhoff RH and Leemans CR: Evaluation of the eighth TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands and the importance of additional HPV DNA testing. *Ann Oncol* 29(5): 1273-1279, 2018. PMID: 29438466. DOI: 10.1093/annonc/mdy060
- Nikitakis NG, Pentenero M, Georgaki M, Poh CF, Peterson DE, Edwards P, Lingen M and Sauk JJ: Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 125(6): 650-669, 2018. PMID: 29709496. DOI: 10.1016/j.oooo.2018.03.012
- Jurel SK, Gupta DS, Singh RD, Singh M and Srivastava S: Genes and oral cancer. *Indian J Hum Genet* 20(1): 4-9, 2018. PMID: 24959008. DOI: 10.4103/0971-6866.132745

- 13 Deschuymer S, Dok R, Laenen A, Hauben E and Nuyts S: Patient selection in human papillomavirus related oropharyngeal cancer: The added value of prognostic models in the new TNM 8th Edition Era. *Front Oncol* 8: 273, 2018. PMID: 30083517. DOI: 10.3389/fonc.2018.00273
- 14 Fakhry C, Westra WH, Wang SJ, van Zante A, MD, Zhang Y, Rettig E, Yin LX, Tyan WR, Ha PK, Wentz A, Koch W, Richmon JD, Eisele DW and D'Souza G: The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer* 123(9): 1566-1575, 2017. PMID: 28241096. DOI: 10.1002/cncr.30353
- 15 David Lu XJ, Liu KYP, Soares RC, Thomson T, Prisman E, Wu J and Poh CF: Potential clinical implications of HPV status and expressions of p53 and cyclin D1 among oropharyngeal cancer patients. *J Oral Pathol Med* 47(10): 945-953, 2018. PMID: 30191616. DOI: 10.1111/jop.12779
- 16 Jung SH, HJ Hwang, Kang D, Park HA, Lee HC, Jeong D, Lee K, Park HJ, Ko YG and Lee JS: mTOR kinase leads to PTEN-loss-induced cellular senescence by phosphorylating p53. *Oncogene* 38(10): 1639-1650, 2019. PMID: 30337688. DOI: 10.1038/s41388-018-0521-8
- 17 Pontes FSC, Pontes HAR, de Souza LL, de Jesus AS, Joaquim AMC, Miyahara LA, Fonseca FP and Pinto Júnior DS: Effect of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) on Akt protein expression is more effective in head and neck cancer cell lineages that retain PTEN protein expression. *J Oral Pathol Med* 47(3): 253-259, 2018. PMID: 29297949. DOI: 10.1111/jop.12676
- 18 Sniectura M, Jaworska M, Mlynarczyk-Liszka J, Goraj-Zajac A, Piglowski W, Lange D, Wozniak G, Nowara E and Suwinski R: PTEN as a prognostic and predictive marker in postoperative radiotherapy for squamous cell cancer of the head and neck. *PLoS One* 7(3): e33396, 2012. PMID: 22413021. DOI: 10.1371/journal.pone.0033396
- 19 Zhao J, Chi J, Gao M, Zhi J, Li Y and Zheng X: Loss of PTEN expression is associated with high MicroRNA 24 level and poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 75(7): 1449.e1-1449.e8, 2017. PMID: 28413152. DOI: 10.1016/j.joms.2017.03.025
- 20 Lee JI, Soria JC, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, Hong WK and Mao L: Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127(12): 1441-1445, 2001. PMID: 11735811. DOI: 10.1001/archotol.127.12.1441
- 21 Lydiatt W, O'Sullivan B and Patel S: Major changes in head and neck staging for 2018. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 38: 505-514, 2018. PMID: 30231400. DOI: 10.1200/EDBK_199697
- 22 Tsurutani J, Fukuoka J, Tsurutani H, Shih JH, Hewitt SM, Travis WD, Jen J and Dennis PA: Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small-cell lung cancer tumors. *J Clin Oncol* 24(2): 306-314, 2006. PMID: 16330671. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.4133
- 23 Miyahara LAN, Pontes FSC, Burbano RMR, Conte Neto N, Guimarães DM, Fonseca FP and Pontes HAR: PTEN allelic loss is an important mechanism in the late stage of development of oral leucoplakia into oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* 72(2): 330-338, 2018. PMID: 16330671. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.4133
- 24 Lotan TL, Wei W, Ludkovski O, Morais CL, Guedes LB, Jamskishvili Y, Lopez K, Hawley ST, Feng Z, Fazli L, Hurtado-Coll A, McKenney JK, Simko J, Carroll PR, Gleave M, Lin DW, Nelson OS, Thompson IM, True LD, Brooks JD, Lance RL, Troyer D and Squire JA: Analytic validation of a clinical-grade PTEN immunohistochemistry assay in prostate cancer by comparison to PTEN FISH. *Mod Pathol* 29(8): 904-914, 2016. PMID: 27174589. DOI: 10.1038/modpathol.2016.88
- 25 Carvalho RM, DE Castro Sant'Anna C, Pinto GR, Paschoal EHA, Tuji FM, Nascimento BB, Soares PC, Ferreira Júnior AG, Rey JA, Chaves LCL and Burbano RR: Frequency of the loss of heterozygosity of the NF2 gene in sporadic spinal schwannomas. *Anticancer Res* 38(4): 2149-2154, 2018. PMID: 29599333 DOI: 10.21873/anticancer.12455
- 26 Davies MP, Gibbs FE, Halliwell N, Joyce KA, Roebuck MM, Rossi ML, Salisbury J, Sibson DR, Tacconi L and Walker C: Mutation in the PTEN/MMAC1 gene in archival low grade and high-grade gliomas. *Br J Cancer* 79(9-10): 1542-1548, 1999. PMID: 10188904. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690246
- 27 Holway AH, Rieger-Christ KM, Miner WR, Cain JW, Dugan JM, Pezza JA, Silverman ML, Shapter A, McLellan R and Summerhayes IC: Somatic mutation of PTEN in vulvar cancer. *Clin Cancer Res* 6(8): 3228-3235, 2000. PMID: 10955808.
- 28 Hühns M, Salem T, Schneider B, Krohn M, Linnebacher M and Prall F: PTEN mutation, loss of heterozygosity, promoter methylation and expression in colorectal carcinoma: two hits on the gene? *Oncol Rep* 31(5): 2236-2244, 2014. PMID: 24647592. DOI: 10.3892/or.2014.3097
- 29 Resnick RM, Cornelissen MT, Wright DK, Eichinger GH, Fox HS, Schegget J and Manos MM: Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst* 82(18): 1477-1484, 1990. PMID: 2167986. DOI: 10.1093/jnci/82.18.1477
- 30 de RodaHusman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ and Snijders PJ: The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76(4): 1057-1062, 1995. PMID: 9049358. DOI: 10.1099/0022-1317-76-4-1057
- 31 Bezerra GMDR, Pontes FSC, Conte Neto N, Nascimento LSD, Souza LL, Pinto Junior DDS and Pontes HAR: Nuclear metallothionein in oral squamous cell carcinoma: clinicopathological parameters and patient survival. *Braz Oral Res* 32: e105, 2018. PMID: 30328895. DOI: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0105
- 32 Singh V, Husain N, Akhtar N, Khan MY, Sonkar AA and Kumar V: p16 and p53 in HPV-positive versus HPV-negative oral squamous cell carcinoma: do pathways differ? *J Oral Pathol Med* 46(90): 744-751, 2017. PMID: 28186650. DOI: 10.1111/jop.12562
- 33 Lopes VKM, Jesus AS, Souza LL, Miyahara LAN, Guimarães DM, Pontes HAR, Pontes FSC and Carvalho PL: Ki-67 protein predicts survival in oral squamous carcinoma cells: an immunohistochemical study. *Braz Oral Res* 31: e66, 2017. PMID: 28832714. DOI: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0066
- 34 Pontes HAR, Pontes FSC, de Jesus AS, Soares MCP, Gonçalves FLN, Botelho TL, Ribeiro JC and Pinto Júnior DS: p-Akt and its relationship with clinicopathological features and survival in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 44(7): 532-537, 2015. PMID: 25244056. DOI: 10.1111/jop.12268
- 35 Prasad K, Rao R, Augustine D, Sowmya SV, Haragannavar V, Sagar P and Sreedhar P: Pathway based prognostic gene expression profile of buccal and gingivo-buccal oral squamous

- cell carcinoma in smokeless tobacco chewers. *Head Neck* 41(2): 388-397, 2019. PMID: 30536474. DOI: 10.1002/hed.25494
- 36 Howell RE, Wright BA and Dewar R: Trends in the incidence of oral cancer in Nova Scotia from 1983 to 1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 95(2): 205-212, 2003. PMID: 12582362. DOI: 10.1067/moe.2003.49
- 37 Moustafa M, Thomas J, Jategaonkar AA, Moubayed S, Moshier E and Urken ML: Epidemiological trends of head and neck cancer in the United States: A SEER Population Study. *J Oral Maxillofac Surg* 75(12): 2562-2572, 2017. PMID: 28618252. DOI: 10.1016/j.joms.2017.05.008
- 38 Squarize CH, Castilho RM and Santos Pinto D Jr: Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. *J Oral Pathol Med* 31(7): 379-384, 2002. PMID: 12224530. DOI: 10.1034/j.1600-0714.2002.00142.x
- 39 Di Cristofano A and Pandolfi PP: The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 100(4): 387-390, 2000. PMID: 10693755. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80674-1
- 40 Squarize CH, Castilho RM, Abrahao AC, Molinolo A, Lingen MW and Gutkind JS: PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. *Neoplasia* 15(5): 461-471, 2013. PMID: 23633918. DOI: 10.1593/neo.121024
- 41 Troeltzsch M, Knösel T, Woodlock T, Troeltzsch M, Pianka A, Probst FA, Mast G, Ehrenfeld M and Otto S: Are there clinical or pathological parameters of maxillary oral squamous cell carcinoma with an influence on the occurrence of neck node metastasis? An appraisal of 92 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 74(1): 9-86, 2016. DOI: 10.1016/j.joms.2015.07.011
- 42 Koncar RF, Feldman R, Bahassi EM and Hashemi Sadraei N: Comparative molecular profiling of HPV-induced squamous cell carcinomas. *Cancer Med* 6(7): 1673-1685, 2017. PMID: 28556593. DOI: 10.1002/cam4.1108
- 43 Lee JI, Soria JC, Hassan KA, El-Naggar AK, Tang X, Liu DD, Hong WK and Mao L: Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127(12): 1441-1445, 2001. PMID: 11735811. DOI: 10.1001/archotol.127.12.1441
- 44 Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, Lu Y, Zhang Q, Du Y, Gilbert B, Freilino M, Sauerwein S, Peyser N, Xiao D, Diergaard B, Wang L, Chiosea S, Seethala R, Johnson J, Kim S, Duvvuri U, Ferris RL, Romkes M, Nukui T, Kwok-Shing Ng P, Garraway LA, Hammerman PS, Mills GB and Grandis JR: Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov* 3(7): 761-769, 2013. PMID: 23619167. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0103
- 45 Sushma PS, Jamil K, Kumar PU, Satyanarayana U, Ramakrishna M and Triveni B: PTEN and p16 genes as epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on south Indian population. *Tumour Biol* 37(6): 7625-732, 2016. PMID: 26687648. DOI: 10.1007/s13277-015-4648-8
- 46 Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S and Viscid R: Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 100(6): 407-420, 2008. PMID: 18334711. DOI: 10.1093/jnci/djn025
- 47 Combes JD and Franceschi S: Role of human papillomavirus in nonoropharyngeal head and neck cancers. *Oral Oncol* 50(5): 370-379, 2014. PMID: 24331868. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2013.11.004
- 48 Lai K, Killingsworth M, Matthews S, Caixeiro N, Evangelista C, Wu X, Wykes J, Samakeh A, Forstner D, Niles N, Hong A and Lee CS: Differences in survival outcome between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma in relation to HPV status. *J Oral Pathol Med* 46(8): 574-582, 2017. PMID: 27935119. DOI: 10.1111/jop.12535
- 49 Satgunaseelan L, Virk SA, Lum T, Gao K, Clark JR and Gupta R: p16 expression independent of human papillomavirus is associated with lower stage and longer disease-free survival in oral cavity squamous cell carcinoma. *Pathology* 48(5): 441-448, 2016. PMID: 27370365. DOI: 10.1016/j.pathol.2016.03.015
- 50 Soares PC, Abdelhay ES, Thuler LCS, Soares BM, Demachki S, Ferro GVR, Assumpção PP, Lamarão LM, Ribeiro Pinto LF and Burbano RMR: HPV positive, wild type TP53, and p16 overexpression correlate with the absence of residual tumors after chemoradiotherapy in anal squamous cell carcinoma. *BMC Gastroenterol* 18(1): 30, 2018. PMID: 29466950. DOI: 10.1186/s12876-018-0758-2
- 51 Smitha T, Mohan CV and Hemavathy S: Prevalence of human papillomavirus16 DNA and p16 protein in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Maxillofac Pathol* 21(1): 76-81, 2017. PMID: 28479691. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_248_16
- 52 Stephen JK and Worsham MJ: Human papillomavirus (HPV) modulation of the HNSCC epigenome. *Methods Mol Biol* 1238: 369-379, 2015. PMID: 25421671. DOI: 10.1007/978-1-4939-1804-1_20
- 53 Kouketsu A, Sato I, Abe S, Oikawa M, Shimizu Y, Takahashi T and Kumamoto H: Detection of human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma: a cohort study of Japanese patients. *J Oral Pathol Med* 45(8): 565-572, 2016. PMID: 25421671. DOI: 10.1007/978-1-4939-1804-1_20
- 54 Tam KW, Zhang W, Soh J, Stastny V, Chen M, Sun H, Thu K, Rios JJ, Yang C, Marconett CN, Selamat SA, Laird-Offringa A, Taguchi A, Hanash S, Shames D, Ma X, Zhang MQ and Gazdar WLL: CDKN2A/p16 inactivation mechanisms and their relationship to smoke exposure and molecular features in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 8(11): 1378-1388, 2013. PMID: 24077454. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182a46c0c
- 55 Zhang B, Zhu W, Yang P, Liu T, Jiang M, He ZN, Zhang SX, Chen WQ and Chen W: Cigarette smoking and p16INK4 α gene promoter hypermethylation in non-small cell lung carcinoma patients: a meta-analysis. *PLoS One* 6(12): e28882, 2011. PMID: 22174919. DOI: 10.1371/journal.pone.0028882
- 56 Kawakita D, Hosono S, Ito H, Oze I, Watanabe M, Hanai N, Hasegawa Y, Tajima K, Murakami S, Tanaka H and Matsuo K: Impact of smoking status on clinical outcome in oral cavity cancer patients. *Oral Oncol* 48(2): 186-191, 2012. PMID: 21996543. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2011.09.012
- 57 Mukoyama N, Suzuki H, Hanai N, Sone M and Hasegawa Y: Pathological tumor volume predicts survival outcomes in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 16(2): 2471-2477, 2018. PMID: 30013639. DOI: 10.3892/ol.2018.8951
- 58 De Silva RK, Siriwardena BSMS, Samaranyaka A, Abeyasinghe W and Tilakaratne WM: A model to predict nodal metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 13(8): e0201755, 2018. PMID: 30091996. DOI: 10.1371/journal.pone.0201755

- 59 Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A and Gillison ML: Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100(4): 261-269, 2008. PMID: 18270337. DOI: 10.1093/jnci/djn011
- 60 Padma R, Kalaivani A, Sundaresan S and Sathish P: The relationship between histological differentiation and disease recurrence of primary oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol* 21(3): 461, 2017. PMID: 29391735. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_241_16
- 61 Harris SL, Thorne LB, Seaman WT, Hayes DN, Couch ME and Kimple RJ: Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck* 33(11): 1622-1627, 2011. PMID: 21990227. DOI: 10.1002/hed.21650

Received September 9, 2020

Revised October 5, 2020

Accepted October 8, 2020

6 DISCUSSÃO

O CEB é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral (BEZERRA *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2017). Essa entidade patológica comumente afeta indivíduos do sexo masculino, pertencentes a uma faixa etária acima de 40 anos, e é frequentemente diagnosticada durante a sexta década de vida, o que está de acordo com os resultados apresentados no presente estudo (LOPES *et al.*, 2017; PONTES *et al.*, 2015; PRASAD *et al.*, 2019). Além disso, o presente estudo também mostrou uma prevalência discreta para pacientes do sexo masculino, corroborando os achados descritos na literatura (HOWELL; WRIGHT; DEWAR, 2003; MOURA *et al.*, 2017). Em relação ao local da lesão, a língua e o assoalho bucal demonstraram maior número de casos, observado anteriormente em estudos já publicados (HOWELL; WRIGHT; DEWAR, 2003; PONTES *et al.*, 2015; MIYAHARA *et al.*, 2018; BEZERRA *et al.*, 2018).

O gene supressor de tumor PTEN também está envolvido na tumorigênese oral, uma vez que foi demonstrado que a inativação ou deleção do PTEN mimetiza a ativação da via de sinalização do mTOR na patogênese do CEB. Neste sentido, esses fatores associados a perda de heterozigossidade deste gene parece ser mecanismos essenciais para tumores agressivos e baixa sobrevida livre de doença e global (DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000; SQUARIZE *et al.*, 2013). Desse modo, é imprescindível ressaltar que dos 119 pacientes com CEB analisados no presente estudo, 40 amostras foram negativas para imunoexpressão de PTEN.

Squarize *et al.* (2013) analisaram a expressão imunohistoquímica de PTEN no CEB, mostraram que a expressão da proteína estava relacionada ao grau de malignidade e que tumores agressivos com alto escore de malignidade não expressavam PTEN, sugerindo que essa proteína pode ser usada como marcador prognóstico. Por outro lado, o presente estudo demonstrou uma associação estatisticamente significativa entre o aumento da expressão de PTEN e tumores T4, metástases em linfonodos e pacientes fumantes. Esse resultado inesperado pode ser explicado pelo fato de que níveis aumentados de PTEN ocorrem para compensar níveis aumentados de Akt, uma vez que influencia diretamente nas vias de progressão molecular das neoplasias malignas (PONTES *et al.*, 2018; MIYAHARA *et al.*, 2018).

Além disso, Troeltzsch e *cols.* (2016) mostraram que tumores pouco diferenciados estão associados à ocorrência de metástases linfonodais, o que corrobora com os resultados deste estudo, visto que foi observado um número aumentado de tumores pouco diferenciados.

Mutações do gene PTEN também foram avaliadas nas lesões e observou-se 16 mutações pontuais e deleção alélica em 19,3% dos tumores analisados. Os resultados mostraram uma associação estatisticamente significativa entre os tumores em estágio IV e a presença de mutação. Estudos anteriores que também avaliaram a expressão gênica e a alteração do número de cópias no CEB demonstrou perda de PTEN em 59,4% dos casos (KONCAR *et al.*, 2017). De fato, mutações somáticas ou deleções de PTEN foram previamente descritas em uma ampla variedade de lesões pré-malignas e malignas, incluindo mama, próstata, endométrio, carcinoma de células escamosas orais, câncer de cabeça e pescoço, glioblastoma e melanoma (LEE *et al.*, 2001). No carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, a perda do gene PTEN foi encontrada em 8,16% e a presença de mutações somáticas em 5,45% (LIU *et al.*, 2013). Curiosamente, a expressão da proteína não foi correlacionada com a presença de mutações, indicando que outro mecanismo pode alterar a função do PTEN.

Outro gene com função supressora e papel significativo no processo carcinogênico é o p16, um inibidor da cinase dependente da ciclina que controla a progressão do tumor através da fase G1 do ciclo celular (SUSHMA *et al.*, 2016). Embora tenha sido observada uma alta expressão de P16 e PTEN no CEB, às vezes está associado a dados clínico-patológicos, não se encontrou relação estatística entre eles.

Estudos recentes descobriram que a expressão anormal do gene supressor de tumor P16 está intimamente associada à infecção por HR-HPV durante a carcinogênese de um subconjunto de HNSCC. Vários estudos descobriram que o p16 é um importante biomarcador de prognóstico no carcinoma de células escamosas da orofaringe (OPSCC) (GILLISON *et al.*, 2008). O papel prognóstico de p16 em Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço (CECP) não orofaríngeo, incluindo CEB, no entanto, não é claro. Vários estudos concluíram que o P16 não tem significado prognóstico em pessoas não OPSCC (COMBES; FRANCESCHI, 2014; FAKHRY *et al.*, 2017; LAI *et al.*, 2017), enquanto outros concluíram o contrário (SATGUNASEELAN *et al.*, 2016).

O DNA do HPV e a expressão de P16 foram sugeridos como padrão ouro para a detecção de infecção por HPV em muitos casos de câncer. A frequência da infecção por HPV é significativamente maior em pacientes com CEE, conforme identificado por meio da detecção do DNA do HPV e da expressão de P16 (SMITHA; MOHAN; HEMAVATHY, 2017). No presente estudo, 64 dos 119 casos analisados eram HPV positivos com alta expressão de P16. Dentre essas amostras positivas, quarenta mostraram a presença dos subtipos 16 ou 18 do vírus. Curiosamente, um estudo avaliou a expressão de p16 com infecção por HPV no HNSCC e observou que a expressão da proteína foi maior na orofaringe,

em que pacientes p16 positivos tiveram melhor sobrevida, demonstrando um marcador prognóstico útil em combinação com o estado do HPV e p16 (STEPHEN; WORSHAM, 2015).

Um estudo recente analisou 174 amostras de OSCC para níveis de p16 e identificação de DNA de HPV e seus genótipos. Do total, 24 amostras apresentavam superexpressão para p16 e 13 com detecção para DNA de HPV. Tal como demonstrado no presente estudo, os genótipos HR-HPV (16 ou 18) foram os mais prevalentes, reforçando a hipótese sobre a imunorreatividade do p16 e a genotipagem do HPV como um marcador útil de infecção viral no OSCC (KOUKETSU *et al.*, 2016).

Vários estudos examinaram a relação entre o tabagismo e os mecanismos de expressão de P16 e relataram que fumar estava significativamente associado à promoção da metilação de p16 (TAM *et al.*, 2013). Semelhantemente, um estudo recente da China relatou que o tabagismo está positivamente correlacionado com a hipermetilação do p16 no NSCLC (ZHANG *et al.*, 2011). No entanto, sua metanálise foi limitada à metilação do promotor, que não é o mecanismo mais comum de inativação para p16. Outra metanálise confirmou que todos os mecanismos de inativação estão genuinamente associados à perda de expressão de proteínas, identificando associações específicas entre os mecanismos de inativação de p16 e outras alterações genéticas e tabagismo (TAM *et al.*, 2013).

Em relação à sobrevida do paciente, observou-se no presente estudo que os pacientes fumantes apresentaram 14 meses a menos de sobrevida quando comparados aos não fumantes. Kawakita *et al.* (2012) explicaram que fumar induz a mutação do p53 e pode desencadear muitas cascatas prejudiciais no corpo humano, levando a um prognóstico ruim. O aumento do tamanho do tumor (3 e 4) demonstrou um risco maior de morte de 1,94 vezes quando comparado com tumores menores, consistente com outros estudos anteriores (MUKOYAMA *et al.*, 2018; TROELTZSCH *et al.*, 2016). Além disso, os resultados apresentados mostraram que a chance de óbito para os pacientes com diagnóstico de metástase linfonodal N2 e N3 foi maior (2,23 vezes maior) do que N0 e N1. O presente estudo demonstra também que a chance de óbito entre aqueles que apresentavam estágios 3 e 4 da doença foi 2 vezes maior do que aqueles estadiados como 1 e 2. A partir desse resultado, pode-se postular que o estadiamento do câncer com base no estágio TNM foi uma importante variável prognóstica (DE SILVA *et al.*, 2018).

As amostras positivas de HPV também foram significativamente relacionadas com o aumento do tamanho do tumor, o que pode ser explicado pela inativação da proteína Rb pela proteína E7 do HPV. Neste cenário, a superexpressão de p16 talvez seja uma tentativa de

recuperar a função normal de Rb, equilibrando assim a progressão celular normal da fase G1 para a fase S no ciclo celular. Além disso, os tumores avançados também mostraram uma associação significativa com a superexpressão de p16, semelhante aos resultados descritos no presente estudo (FAKHRY *et al.*, 2008).

Além disso, a possibilidade de morte de um paciente com grau histológico pouco diferenciado foi 1,76 vezes maior do que aqueles com tumores bem diferenciados, compatível com estudos anteriores (PADMA *et al.*, 2017). A agressividade do tumor pode ser explicada como a associação desse grau histológico com metástases linfonodais, índice de recorrência e metástases à distância (DE SILVA *et al.*, 2018; KAWAKITA *et al.*, 2012).

Em relação ao hábito de fumar e a ausência de expressão da proteína p16 para menor sobrevida. Satgunaseelan e cols. (2016) explicaram que a expressão de p16 medeia seus efeitos na sobrevida, controlando a capacidade proliferativa do tumor primário e seu potencial invasivo, o que pode levar a um melhor prognóstico para os pacientes.

Além disso, o p16 mostrou sensibilizar as células HPV-positivas à radiação ionizante ao inibir a resposta a danos no DNA mediada por recombinação homóloga e diminuir a expressão da ciclina D1. Acredita-se que a inibição da resposta ao dano ao DNA por p16 seja independente de sua atividade de inibição da regulação do ciclo celular de CDK4/6 (HARRIS *et al.*, 2011).

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados no presente estudo, pode-se concluir que PTEN e P16 são genes supressores tumorais que controlam a progressão tumoral. No estudo atual, PTEN demonstrou uma maior reatividade em estágios avançados da doença (mais sete vezes). Embora o P16 tenha sido fortemente associado ao HPV, não foi demonstrada associação significativa com nenhum fator clínico-patológico analisado neste estudo.

Ambas as proteínas apresentam grande importância no prognóstico dos pacientes. Foi demonstrado que a presença viral diminui a agressividade do tumor. Além disso, lesões em estágios avançados apresentaram menor sobrevida. Observou-se que pacientes fumantes com ausência de p16 estão significativamente associados a uma taxa de sobrevida duas vezes menor.

À medida que aumenta a compreensão do papel do PTEN na iniciação e progressão do câncer, esse conhecimento acumulado pode ser usado para a concepção de novos métodos terapêuticos, tais como a inibição do gene proliferativo AKT, que é a via mais comum associada à progressão do CEB.

REFERÊNCIAS

- ABNET, C. C. *et al.* Tooth loss and lack of regular oral hygiene are associated with high risk of esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers & prevention**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 3062-3068, 2008. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0558.
- ALLAMEH, A. *et al.* Promoter DNA Methylation and mRNA Expression Level of p16 Gene in Oral Squamous Cell Carcinoma: Correlation with Clinicopathological Characteristics. **Pathology oncology research**, Budapest, Hungary, v. 25, n. 4, p. 1535-1543, Oct. 2019. DOI: 10.1007/s12253-018-0542-1.
- BARNES, L., EVERSON, J.W., REICHART, P., SIDRANSKY, D. **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. 327.
- BERSANI, C. *et al.* Overexpression of FGFR3 in HPV-positive tonsillar and base of tongue cancer is correlated to outcome. **Anticancer research**, [S. l.], v. 38, n. 8, p. 4683-4690, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21873/anticancer.12774>.
- BETIOL, J.; VILLA, L. L.; SICHERO, L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 217-226, 2013. DOI: 10.1590/1414-431X20132703.
- BEZERRA, G. M. R. *et al.* Nuclear metallothionein in oral squamous cell carcinoma: clinicopathological parameters and patient survival. **Brazilian oral research**, [S. l.], v. 32, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0105>.
- 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**, [S. l.], v. 31, n. 28, p. 3322-3332, Jul. 2012. DOI: 10.1038/onc.2011.494.
- BLOCHING, M. *et al.* The influence of oral hygiene on salivary quality in the Ames Test, as a marker for genotoxic effects. **Oral oncology**, [S. l.], v. 43, n. 9, p. 933-939, Oct. 2007. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2006.11.006.
- BOYLE, J. O. *et al.* The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. **Cancer research**, [S. l.], v. 53, p. 4477, 1993.
- BURGUCU, D. *et al.* Tbx3 represses PTEN and is over-expressed in head and neck squamous cell carcinoma. **BioMed Central cancer**, London, n. 12, p. 1471-2407, Oct. 2012. DOI: 10.1186/1471-2407-12-481.
- CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, [S. l.], v. 296, n. 5573, p. 1655-1657, May. 2002. DOI: 10.1126/science.296.5573.1655.

- CHANG, F. *et al.* Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, [S. l.], v. 17, p. 590-603, Mar. 2003. DOI: 10.1038/sj.leu.2402824.
- CHATURVEDI, A. K. *et al.* Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. **Journal of clinical oncology**, [S. l.], v. 31, n. 36, p. 4550, 2013. DOI: 10.1200/JCO.2013.50.3870.
- CHOW, L. M. L.; BAKER, S. J. PTEN function in normal and neoplastic growth. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 184-196, Sep. 2006. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.11.042.
- CIDADO, J.; PARK, B. H. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway for breast cancer therapy. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, New York, v. 17, n. 3-4, p. 205-216, dec. 2012. DOI: 10.1007/s10911-012-9264-2.
- COMBES, J. D.; FRANCESCHI, S. Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers. **Oral oncology**, [S. l.], v. 50, n. 5, p. 370-379, 2014. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2013.11.004.
- DE RODA HUSMAN, A. M. *et al.* The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of general virology**, [S. l.], v. 76, n. 4, p. 1057-1062, 1995. DOI: 10.1099/0022-1317-76-4-1057.
- DE SILVA, R. K. *et al.* A model to predict nodal metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. **PLoS One**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. e0201755, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0201755.
- DESCHUYMER, S. *et al.* Patient selection in human papillomavirus related oropharyngeal cancer: the added value of prognostic models in the new TNM 8th edition era. **Frontiers in oncology**, [S. l.], v. 8, p. 273, 2018. DOI: 10.3389/fonc.2018.00273.
- DI CRISTOFANO, A.; PANDOLFI, P. P. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. **Cell**, [S. l.], v. 100, n. 4, p. 387-90, Feb. 2000. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80674-1.
- FAKHRY, C. *et al.* Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 100, n. 4, p. 261-269, 2008. DOI: 10.1093/jnci/djn011.
- FAKHRY, C. *et al.* The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. **Cancer**, [S. l.], v. 123, n. 9, p. 1566-1575, 2017. DOI: 10.1002/cncr.30353.
- FERLAZZO, N. *et al.* Influence of MTHFR Genetic Background on p16 and MGMT Methylation in Oral Squamous Cell Cancer. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 724, 2017. DOI: 10.3390/ijms18040724.

FERRAZ, L. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **Journal of the Health Sciences Institute**, [S. l.], v. 30, n. 2, 2012.

FRANCESCHI, S. *et al.* Risk factors for cancer of the tongue and the mouth. A case-control study from northern Italy. **Cancer**, [S. l.], v. 70, n. 9, p. 2227-2233, Nov. 1992. DOI: 10.1002/1097-0142(19921101)70:9<2227::aid-cnrc2820700902>3.0.co;2-z.

FURNISS, C. S. *et al.* Human papillomavirus 6 seropositivity is associated with risk of head and neck squamous cell carcinoma, independent of tobacco and alcohol use. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 534-541, 2009. DOI: 10.1093/annonc/mdn643.

FURTADO, Y. L. *et al.* The Presence of Methylation of the p16^{INK4A} Gene and Human Papillomavirus in High-grade Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. *Diagnostic molecular pathology*, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 15-9, 2010. DOI: 10.1097/PDM.0b013e3181aa8f64.

GALBIATTI, A. L. S. *et al.* Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 79, n. 2, p. 239-247, 2013. DOI: 10.5935/1808-8694.20130041.

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**, [S. l.], v. 45, n. 10, p. e150-4, Oct. 2009. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2009.05.563.

GANLY, I.; SOUTAR, D. S.; BROWN, R.; KAYE, S. B. p53 alterations in recurrent squamous cell cancer of the head and neck refractory to radiotherapy. **British journal of cancer**, [S. l.], v. 82, n. 2, p. 392, Jan. 2000. DOI: 10.1054/bjoc.1999.0932.

GERICKE, A.; MUNSON, M.; ROSS, A. H. Regulation of PTEN phosphatase. **Gene**, [S. l.], v. 374, p. 1-9, Jun. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.02.024>.

GILLISON, M. L. *et al.* Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 100, n. 6, p. 407-420, 2008.

GIUDICE, F. S.; SQUARIZE, C. H. The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. **Journal of carcinogenesis & mutagenesis**, [S. l.], v. 2, Suppl 5, p. 003, Aug. 2013. DOI: 10.4172/2157-2518.S5-003.

MAHUL, A. *et al.* **AJCC Cancer Staging Manual Eighth Edition**. Springer. 2017. DOI 10.1007/978-3-319-40618-3.

HALL, B. *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**, [S. l.], v.11, p.45, Feb. 2013. DOI: 10.1186/1479-5876-11-45.

HARRIS, S. L. *et al.* Association of p16INK4a overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. **Head & neck**, [S. l.], v. 33, n. 11, p. 1622-1627, 2011.

HAUPT, S.; BERGER, M.; GOLDBERG, Z.; HAUPT, Y. Apoptosis - the p53 network. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 116, n. Pt 20, p. 4077-85, Oct. 2003. DOI: 10.1242/jcs.00739.

HERS, I.; VINCENT, E. E; TAVARÉ, J. M. Akt signalling in health and disease. **Cellular Signalling**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 1515-1527, Oct. 2011. DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.05.004.

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; HARRIS, C. C. p53 mutations in human cancers. **Science**, [S. l.], v. 253, n. 5015, p. 49-53, Jul. 1991. DOI: 10.1126/science.1905840.

HOWELL, R. E.; WRIGHT, B. A.; DEWAR, R. Trends in the incidence of oral cancer in Nova Scotia from 1983 to 1997. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, [S. l.], v. 95, n. 2, p. 205-212, 2003. DOI: 10.1067/moe.2003.49.

HUSAIN, N.; NEYAZ, A. Human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma: controversies and new concepts. **Journal of oral biology and craniofacial research**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 198-205, 2017. DOI: 10.1016/j.jobcr.2017.08.003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro - RJ, 2020.

JANKU, F. *et al.* PIK3CA mutations in patients with advanced cancer treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. **Molecular cancer therapeutics**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 558-565, Mar. 2011. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0994.

JIANG, S.; DONG, Y. Human papilloma virus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future. **Current problems in cancer**, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 323-327 Sep-Oct. 2017. DOI: 10.1016/j.currproblcancer.2017.02.006.

JOHNSON, N. W; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A. A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. **Periodontology 2000**, [S. l.], v. 57, n. 1, p.19-37, Oct. 2011. DOI: 10.1111/j.1600-0757.2011.00401.x.

JUNG, S. H. *et al.* mTOR kinase leads to PTEN-loss-induced cellular senescence by phosphorylating p53. **Oncogene**, [S. l.], v. 38, n. 10, p. 1639-1650, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0521-8>.

JUREL, S. K. *et al.* Genes and oral cancer. **Indian journal of human genetics**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 4, 2014. DOI: 10.4103/0971-6866.132745.

KAMINAGAKURA, E. *et al.* High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. **International journal of cancer**, [S. l.], v. 130, n. 8, p. 1726-1732, 2012. DOI: 10.1002/ijc.26185.

KATSO, R. *et al.* Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. **Annual review of cell and developmental biology**, [S. l.], v. 17, p. 615-675, 2001. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.615.

KAWAKITA, D. *et al.* Impact of smoking status on clinical outcome in oral cavity cancer patients. **Oral oncology**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 186-191, 2012. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2011.09.012.

KONCAR, R. F. *et al.* Comparative molecular profiling of HPV-induced squamous cell carcinomas. **Cancer medicine**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 1673-1685, 2017. DOI: 10.1002/cam4.1108.

KOTAKE, Y. *et al.* Transcriptional regulation of the p16 tumor suppressor gene. **Anticancer research**, [S. l.], v. 35, n. 8, p. 4397-4401, 2015.

KOUKETSU, A. *et al.* Detection of human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma: a cohort study of Japanese patients. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [S. l.], v. 45, n. 8, p. 565-572, 2016. DOI: 10.1111/jop.12416.

KRISHNA RAO, S. V.; MEJIA, G.; ROBERTS-THOMSON, K.; LOGAN, R. Epidemiology of Oral Cancer in Asia in the Past Decade- An Update (2000-2012). **Asian Pacific journal of cancer prevention**, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 5567-5577, 2013. DOI: 10.7314/apjcp.2013.14.10.5567.

LAI, K. *et al.* Differences in survival outcome between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma in relation to HPV status. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [S. l.], v. 46, n. 8, p. 574-582, 2017. DOI: 10.1111/jop.12535.

LEE, J. I. *et al.* Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. **Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery**, [S. l.], v. 127, n. 12, p. 1441-1445, 2001. DOI: 10.1001/archotol.127.12.1441.

LI, A. G. *et al.* Mechanistic Insights into Maintenance of p53 Acetylation by PTEN. **Molecular cell**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 575-587, Aug. 2006. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.06.028.

LI, G. *et al.* The mechanism involved in the loss of PTEN expression in NSCLC tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 418, n. 3, p. 547-552, Feb. 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.065.

LIM, A. M. *et al.* Differential mechanisms of CDKN2A (p16) alteration in oral tongue squamous cell carcinomas and correlation with patient outcome. **International journal of cancer**, [S. l.], v. 135, n. 4, p. 887-95, 2014. DOI: 10.1002/ijc.28727.

LIU, L. *et al.* Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. **Cancer Discov**, [S. l.], v.3, n.7, p.761-769, jul. 2013.

LJUBOJEVIC, S.; SKERLEV, M. HPV-associated diseases. **Clinics in dermatology**, [S. l.], v. 32, n. 2, p. 227-234, 2014.

LO, W. L. *et al.* Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factor affecting survival. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, [S. l.], v. 61, n. 7, p. 751-758, Jul. 2003. DOI: 10.1016/s0278-2391(03)00149-6.

LOPES, V. K. M. *et al.* Ki-67 protein predicts survival in oral squamous carcinoma cells: an immunohistochemical study. **Brazilian oral research**, São Paulo, v. 31, 2017. DOI: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0066.

LÓPEZ, R. V. M. *et al.* Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. **Cancer Causes & Control**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 461-471, 2014. DOI: 10.1007/s10552-014-0348-8.

LOU, S.; CHEN, J, MO X. The association of PTEN hypermethylation and breast cancer: a meta-analysis. **Onco Targets and Therapy**, [S. l.], v.9, p. 5643-5650, 2016.

LU, X. J. D. *et al.* Potential clinical implications of HPV status and expressions of p53 and cyclin D1 among oropharyngeal cancer patients. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [S. l.], v. 47, n. 10, p. 945-953, 2018. DOI: 10.1111/jop.12779.

LUI, L. *et al.* Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. **Cancer discovery**, [S. l.], v. 3, n. 7, p. 761-769, Jul. 2013. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0103.

MARTÍN-HERNÁN, F. *et al.* Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. e439, 2013.

MARUR, S. *et al.* HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. **The lancet oncology**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 781-789, 2010. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70017-6.

MARUR, S.; FORASTIERE, A. A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, [S. l.], v. 91, n. 3, p. 386–396, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.12.017>.

MAYO, L D.; DONNER, D. B. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. **Trends in biochemical sciences**. v. 27, n. 9, p. 462-7, Sep. 2002. DOI: [10.1016/s0968-0004\(02\)02166-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02166-7).

MELO, B. A. de C. *et al.* Human papillomavirus infection and oral squamous cell carcinoma - a systematic review. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 87, n. 3, p. 346–352, 2021. DOI: [10.1016/j.bjorl.2020.10.017](https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2020.10.017).

MING, M.; HE, Y. PTEN in DNA Damage Repair. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 312, n. 2, p. 125-129, Jun. 2012. DOI: [10.1016/j.canlet.2012.01.003](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.003).

MIYAHARA, L. A. N. *et al.* PTEN allelic loss is an important mechanism in the late stage of development of oral leukoplakia into oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 330-338, 2018. DOI: [10.1111/his.13381](https://doi.org/10.1111/his.13381).

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. **Clinical cancer research**, [S. l.], v. 13, n. 17, p. 4964-4973, 2007. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-07-1041](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1041).

MOLINOLO, A. A. *et al.* mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. **Clinical cancer research**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 2558-2568, 2012. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-11-2824](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2824).

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 research**, [S. l.], v. 69, n. 3, p. 1099–1108, Feb. 2009. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-08-3240](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3240).

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 oncology**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 170-174, Mar. 2000. DOI: [10.1016/s1368-8375\(99\)00084-6](https://doi.org/10.1016/s1368-8375(99)00084-6).

MOURAD, M. *et al.* Epidemiological trends of head and neck cancer in the United States: a SEER population study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [S. l.], v. 75, n. 12, p. 2562-2572, 2017. DOI: [10.1016/j.joms.2017.05.008](https://doi.org/10.1016/j.joms.2017.05.008).

MUKOYAMA, N. *et al.* Pathological tumor volume predicts survival outcomes in oral squamous cell carcinoma. **Oncology letters**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 2471-2477, 2018.

MUÑOZ, N. *et al.* HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, [S. l.], v. 24, p. S1-S10, 2006. DOI: [10.1016/j.vaccine.2006.05.115](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.115).

MURPHY, N. *et al.* P16^{INK4a}, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. **Journal of clinical pathology**, [S. l.], v. 58, p. 525-34, 2005. DOI: 10.1136/jcp.2004.018895.

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 surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, [S. l.], v. 118, n. 5, p. 566-572, Nov. 2014. DOI: 10.1016/j.oooo.2014.08.005.

NEVILLE, B. W. *et al.* Patologia Oral & Maxilofacial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 288p.

NIKITAKIS, N. G. *et al.* Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, [S. l.], v. 125, n. 6, p. 650-669, 2018. DOI: 10.1016/j.oooo.2018.03.012.

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

PADHI, S. *et al.* Clinico-pathological correlation of b-catenin and telomere dysfunction in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Journal of Cancer**, [S. l.], 2015; v. 6, n. 2, p. 192-202, 2015. DOI: 10.7150/jca.9558.

PADMA, R. *et al.* The relationship between histological differentiation and disease recurrence of primary oral squamous cell carcinoma. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 461, 2017.

PATHARE, S. M. *et al.* Clinicopathological and prognostic implications of genetic alterations in oral cancers. **Oncology Letter**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 445-451, May, 2011. DOI: 10.3892/ol.2011.271.

PLANCHON, S. M.; WAITE, K.; ENG, C. The nuclear affairs of PTEN. **Journal of cell science**, [[S. l.], v. 121, n. Pt 3, p. 249-253, Feb. 2008. DOI: 10.1242/jcs.022459.

PONTES, F. S. C. *et al.* Effect of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) on Akt protein expression is more effective in head and neck cancer cell lineages that retain PTEN protein expression. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 253-259, 2018. DOI: 10.1111/jop.12676.

PONTES, H. A. R. *et al.* p-Akt and its relationship with clinicopathological features and survival in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [S. l.], v. 44, n. 7, p. 532-537, 2015.

- PRASAD, K. *et al.* Pathway based prognostic gene expression profile of buccal and gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma in smokeless tobacco chewers. **Head & neck**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 388-397, 2019. DOI: 10.1002/hed.25494.
- PRIGGE, E. S. *et al.* P16 (INK4a)/Ki-67 co-expression specifically identifies transformed cells in the head and neck region. **International journal of cancer**, [S. l.], v. 136, n. 7, p. 1589-99, 2015. DOI: 10.1002/ijc.29130.
- RAHMANI, A. *et al.* Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. **International journal of clinical and experimental pathology**, [S. l.], v. 5, n. 9, p. 965-971, 2012.
- REED, A. L. *et al.* High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer research**, [S. l.], v. 56, n. 17, p. 3630-3, 1996.
- RESNICK, R. M. *et al.* Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 82, n. 18, p. 1477-1484, 1990. DOI: 10.1093/jnci/82.18.1477.
- SATGUNASEELAN, L. *et al.* p16 expression independent of human papillomavirus is associated with lower stage and longer disease-free survival in oral cavity squamous cell carcinoma. **Pathology**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 441-448, 2016.
- SCULLY, C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 306-11, May, 2011. DOI: 10.4317/medoral.16.e306.
- SEBASTIAN, P. *et al.* Anterior tongue cancer with no history of tobacco and alcohol use maybe a distinct molecular and clinical entity. **Journal of oral pathology & medicine**, [S. l.], v. 43, n. 8, p. 593-599, Sep. 2014. DOI: 10.1111/jop.12175.
- SHENG, Z. *et al.* Detection of high-risk human papillomavirus subtypes in cervical glandular neoplasia by in situ hybridization. **International journal of clinical and experimental pathology**, [S. l.], v. 6, n. 10, p. 2168, 2013.
- SIMONATO, L. E.; MIYAHARA, G. I. O papel do papilomavírus humano na carcinogênese bucal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 53, n. 4, p. 471-476, 2007.
- SINGH, V. *et al.* p16 and p53 in HPV-positive versus HPV-negative oral squamous cell carcinoma: do pathways differ?. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. 744-751, 2017. DOI: 10.1111/jop.12562.
- SKINNER, H. D. *et al.* Clinical characteristics of patients with multiple potentially human papillomavirus-related malignancies. **Head & neck**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 819-825, 2014. DOI: 10.1002/hed.23379.

- SKINNER, M. A new molecular pathway for *TP53*. **Nature Reviews Molecular CellBiology**, [S. l.], v. 12, p. 402–403, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm3138>.
- SMITHA, T.; MOHAN, C. V.; HEMAVATHY, S. Prevalence of human papillomavirus16 DNA and p16INK4a protein in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 76, 2017.
- 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**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. e33396, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0033396.
- SOBIN, L.H.; WITTEKIND, C.H. **TNM Classification of Malignant Tumours**. Wiley, New York, 2002.
- SORIA, J. C. *et al.* Telomerase activation cooperates with inactivation of p16 in early head and neck tumorigenesis. **British journal of cancer**, [S. l.], 2001; v. 84, n. 4, p. 504-11. DOI: 10.1054/bjoc.2000.1647.
- SQUARIZE, C. H. *et al.* PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. **Neoplasia**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 461-471, 2013.
- 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. **Journal of oral pathology & medicine**, [S. l.], v. 31, n. 7, p. 379-384, 2002.
- STECK, P. A. *et al.* Identification of a candidate tumour suppressor gene, *MMAC1*, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nature genetics**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 356-362, Apr. 1997. DOI: 10.1038/ng0497-356.
- STEPHEN, J. K.; WORSHAM, M. J. Human papilloma virus (HPV) modulation of the HNSCC epigenome. In: **CANCER Epigenetics**. New York, NY: Humana Press, 2015. p. 369-379.
- STRANSKY, N. *et al.* The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. **Science**, [S. l.], v.333, n. 6046, p. 1157-1160, Aug. 2011. DOI: 10.1126/science.1208130.
- SUGERMAN, P. B.; JOSEPH, B. K.; SAVAGE, N. W. The role of oncogenes, tumour suppressor genes and growth factors in oral squamous cell carcinoma: a case of apoptosis versus proliferation. **Oral diseases**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 172-88, 2005. DOI: 10.1111/j.1601-0825.1995.tb00181.x.
- SUN, Z. *et al.* Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Risk Factors, Molecular Alterations, Immunology and Peptide Vaccines. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 1–18, 2022.

SUSHMA, P. S. *et al.* PTEN and p16 genes as epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on south Indian population. **Tumor Biology**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 7625-7632, 2016.

TAM, K. W. *et al.* CDKN2A/p16 inactivation mechanisms and their relationship to smoke exposure and molecular features in non-small-cell lung cancer. **Journal of thoracic oncology**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 1378-1388, 2013. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3182a46c0c.

TAN, M.; MYERS, J. N.; AGRAWAL, N. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma genomics. **Otolaryngologic clinics of North America**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 545-66, Aug. 2013.. doi: 10.1016/j.otc.2013.04.001.

TEZAL, M. *et al.* Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 2406-2412, Sep. 2009. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0334.

TROELTZSCH, M. *et al.* Are there clinical or pathological parameters of maxillary oral squamous cell carcinoma with an influence on the occurrence of neck node metastasis? An appraisal of 92 patients. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 79-86, 2016.

TSURUTANI, J. *et al.* Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small-cell lung cancer tumors. **Journal of clinical oncology**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 306-314, 2006. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.4133.

VIGNESWARAN, N.; WILLIAMS, M. D. Epidemiologic Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. **Oral and maxillofacial surgery clinics of North America**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 123-141, May, 2014. doi: 10.1016/j.coms.2014.01.001.

VORA, H. H. *et al.* Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. **Journal of surgical oncology**, [S. l.], v. 82, n. 1, p. 34-50. 2003. DOI: 10.1002/jso.10183.

WANG, X. *et al.* Feedback between E2F1 and CIP2A regulated by human papilloma virus E7 in cervical cancer: implications for prognosis. **American journal of translational research**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 2327-2339, May. 2017.

WARNAKULASURIYA, S.; SUTHERLAND, G.; SCULLY, C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. **Oral Oncology**, [S. l.], v. 41, n. 3 p. 244-260, Mar. 2005. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2004.08.010.

WON, H. S. *et al.* Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, [S. l.], v. 48, n. 10, p. 985-990, Oct. 2012. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.04.013.

YU, Z. *et al.* Phosphorylation of Akt (Ser473) predicts poor clinical outcome in oropharyngeal squamous cell cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention**, [S. l.], v.16, n. 3, p.553–558, Mar. 2007. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0121.

ZARAVINOS, A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. **Oncotarget**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 3956, 2014. DOI: 10.18632/oncotarget.1934.

ZHANG, B. *et al.* Cigarette smoking and p16INK4a gene promoter hypermethylation in non-small cell lung carcinoma patients: a meta-analysis. **PloS one**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. e28882, 2011.

ZHAO, H. *et al.* Impact of Oral Hygiene on Prognosis in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Lower Gingiva. **Frontiers in Surgery**, [S. l.], v. 8, n. September, p. 1–6, 2021. DOI: 10.3389/fsurg.2021.711986.

ZHAO, J. *et al.* Loss of PTEN expression is associated with high microRNA 24 level and poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [S. l.], v. 75, n. 7, p. 1449. e1-1449. e8, 2017.