

**ESTUDO DA VIA DO PTEN/MTOR/AKT NOS
CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE GENGIVA,
REBORDO ALVEOLAR E PALATO DURO**

DARKLÊ FERREIRA MODESTO

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza
Begnami**

Co-Orientadora: Prof. Dra Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Modesto, Darklê Ferreira

Estudo da via do PTEN/MTOR/AKT nos carcinomas epidermóides de gengiva, rebordo alveolar e palato duro / Darklê Ferreira Modesto - São Paulo, 2012.

78p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Descritores: 1. TUMORES DA GENGIVA. 2. REBORDO ALVEOLAR. 3. PALATO DURO. 4. NEOPLASIAS DA BOCA. 5. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE. 6. IMUNOISTOQUÍMICA.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Eliete Maria D. F. Modesto e ao meu pai Ivan Pires Modesto que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos dessa trajetória e pelo amor incondicional.

A minha irmã Sue Ellen F. Modesto por estar sempre ao meu lado em mais essa etapa de minha vida e dando o apoio necessário nas horas mais difíceis.

Ao meu esposo Max Alexsandro R. Barbosa por entender o meu querer em subir mais um degrau em meus conhecimentos e me ajudar a seguir em frente.

A minha orientadora Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami pela oportunidade e receptividade em me acolher no Departamento de Anatomia Patológica, e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares por acreditar em mim e pela compreensão.

Aos técnicos e auxiliares do Departamento de Anatomia Patológica, nas pessoas de Fábio Lourenço Vieira e Glauber, que me ajudaram com o levantamento das lâminas e blocos.

Ao José Ivanildo Neves e ao Carlinhos pela confecção do FISH e TMAs respectivamente.

A pós-doc Dra Cláudia M. C. Camillo pela dedicação, paciência e ajuda em me ensinar a técnica de imunoistoquímica.

A equipe do SAME, Luciano Feitosa, Paulo Passetti e Odirlei Oliveira pela paciência e competência no atendimento.

RESUMO

Modesto DF. **Estudo da via do PTEN/MTOR/AKT nos carcinomas epidermóides de gengiva, rebordo alveolar e palato duro.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

OBJETIVOS: O desenvolvimento do câncer de cavidade oral está relacionado com o acúmulo de alterações genéticas. A ativação da proteína AKT está relacionada com a proliferação e progressão tumoral em diferentes tipos de neoplasias. Acredita-se que as MAP cinases juntamente com a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR e PTEN promovam a proliferação não coordenada e o aumento de sobrevida celular, agindo, portanto na progressão do câncer. Contudo, estudos sobre as expressões destas proteínas nos carcinomas epidermóides (CEC) de boca ainda são escassos e controversos. **MÉTODOS:** As expressões imunoistoquímicas de PI3K, p-mTOR, p-AKT, p-MAPK e PTEN foram detectadas em 125 amostras de CEC de gengiva, rebordo alveolar e palato duro, e o estatus do gene PTEN foi pesquisado por FISH em 84 destas amostras. Foram analisadas as correlações das proteínas supracitadas com dados clinicopatológicos e de sobrevida. **RESULTADOS:** Associações estatisticamente significativas foram encontradas entre localização do tumor e gênero sendo tumores de gengiva e palato duro predominantes em homens e tumores de rebordo alveolar em mulheres ($p=0,002$). Os tumores de palato duro também mostraram associação com o tabagismo ($p=0,010$). Em relação aos marcadores imunoistoquímicos, observamos positividade citoplasmática das proteínas PI3K, p-mTOR, p-MAPK, p-Akt e PTEN na maioria dos casos (92,4%, 88,2%, 88,3%, 94,2% e 75% respectivamente). Positividade nuclear foi observada para as proteínas p-mTOR, PTEN, p-Akt e p-MAPK (42,9%, 72%, 64,2 % e 58,2% respectivamente). A expressão na membrana celular foi encontrada somente para a proteína p-mTOR em 44,5% dos casos. Correlação estatisticamente significativa foi encontrada somente entre a expressão da proteína PI3K e etilismo ($p=0,026$) e a expressão de p-MAPK e CEC estádios III e IV ($p=0,0042$). Menores taxas de sobrevida livre de doença foram encontradas em pacientes com CEC III/IV ($p=0,001$). Pacientes com positividade

nuclear de p-mTOR mostraram um aumento significativo nas taxas de sobrevida livre de doença. Os pacientes com deleção de PTEN mostraram probabilidades de sobrevida livre de doença e sobrevida global nas análises univariadas maiores que as dos pacientes diplóides para PTEN ($p=0,011$ e $p=0,044$ respectivamente).

CONCLUSÕES: As observações sugerem que a via PTEN/mTOR/Akt, PI3K, MAPK exerce um papel importante nos carcinomas de gengiva, rebordo alveolar e palato duro, sendo a deleção de PTEN um fator prognóstico associado a melhor sobrevida. Novos estudos com maior casuística devem ser realizados para a validação destes dados.

SUMMARY

Modesto DF. [Study of the PTEN/MTOR/AKT pathway in squamous cell carcinoma of gums, alveolar ridge and hard palate]. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

OBJECTIVES: The development of oral cavity cancer is related to the accumulation of genetic alterations. The activation of Akt is associated to proliferation and progression of many malignancies. It is believed that the MAP kinases with PI3K/Akt/mTOR signaling pathway promote uncoordinated proliferation of PTEN and increased cell survival, acting in the cancer progression. However, studies of these proteins expression of oral squamous cell carcinoma are few and controversial. **METHODS:** The expression of PI3K, p-mTOR, p-AKT, p-MAPK and PTEN was detected by immunohistochemistry in samples of 125 cancers of the gums, alveolar ridge and hard palate, and the status of PTEN was investigated by FISH in 84 samples. We determined the correlations between these proteins and clinicopathological data and survival. **RESULTS:** Statistically significant associations were found between tumor location and gender. Gum and hard palate located tumors were predominant in men and alveolar tumors in women ($p = 0.002$). Tumors of the hard palate also showed an association with smoking ($p = 0.010$). Regarding immunohistochemical markers, we observed positivity of PI3K proteins, p-mTOR, p-MAPK, p-Akt and PTEN in the cytoplasm of the most cases (92.4%, 88.2%, 88.3%, 94.2% and 75% respectively). Nuclear positivity was observed for proteins p-mTOR, PTEN, p-Akt and p-MAPK (42.9%, 72%, 64.2% and 58.2% respectively). The expression on the membrane cell was found only for the p-mTOR protein in 44.5% of cases. Statistically significant correlation was found only between the PI3K protein expression and alcohol consumption ($p = 0.026$) and between p-MAPK expression and SCC stages III and IV ($p = 0.0042$). Lower rates of disease-free survival was found in patients with SCC III / IV ($p = 0.001$). Patients with nuclear positivity of p-mTOR showed a significant increase in disease-free survival rates. Patients with PTEN deletions showed probabilities of disease-free

survival and overall survival in the univariate analyzes greater than those of PTEN diploid patients ($p = 0.011$ and $p = 0.044$ respectively). **CONCLUSIONS:** Our findings pointed the PTEN / mTOR / Akt, PI3K, MAPK pathway as important players in carcinoma of the gum, alveolar ridge and hard palate. However, further studies should be conducted to confirm these findings.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de ativação e principais alvos envolvidos na via de sinalização das proteínas PI3K/Akt/mTOR.....	10
Figura 2	Mecanismo de ativação e principais alvos envolvidos na via de sinalização das proteínas RAS-RAF-MAPK.....	11
Figura 3	Estrutura protéica da proteína PTEN.....	12
Figura 4	Imagem esquemática do processo de preparação dos blocos receptores e das lâminas do TMA para o TMA.....	21
Figura 5	Carcinoma epidermóide em rebordo alveolar inferior com marcação citoplasmática para PI3K (tamanho original 18.0x).....	37
Figura 6	Carcinoma epidermóide em rebordo alveolar superior com marcação citoplasmática de p-mTOR (tamanho original 11.0x).....	37
Figura 7	Carcinoma epidermóide em rebordo alveolar superior com marcação citoplasmática e nuclear de p-Akt (tamanho original 14.4x).....	38
Figura 8	Carcinoma epidermóide em gengiva inferior com marcação nuclear de p-MAPK (tamanho original 20.0x).....	38
Figura 9	Carcinoma epidermóide em rebordo alveolar superior com marcação citoplasmática de PTEN (tamanho original 20.0x).....	39

Figura 10	Carcinoma epidermóide em rebordo alveolar inferior com marcação citoplasmática e nuclear de PTEN (tamanho original 18.0x).....	40
Figura 11	FISH do PTEN mostrando núcleo diplóide.....	41
Figura 12	FISH do PTEN mostrando núcleo com deleção.....	42
Figura 13	Curva de Kaplan-Meier para o grau histológico do tumor em relação à sobrevida livre de doença.....	53
Figura 14	Curva de Kaplan-Meier para a expressão nuclear de mTOR em relação à sobrevida livre de doença.....	54
Figura 15	Curva de Kaplan-Meier do estatus do gene PTEN por FISH em relação à sobrevida livre de doença.....	55
Figura 16	Curva de Kaplan-Meier para idade em relação à sobrevida global.....	58
Figura 17	Curva de Kaplan-Meier do estatus do gene PTEN por FISH em relação à sobrevida global.....	59

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Anticorpos, clones, diluições e controles positivos usados na imunoistoquímica.....	21
Tabela 1	Número de porcentagem de pacientes segundo idade, sexo e local do tumor.....	29
Tabela 2	Número de porcentagem de pacientes segundo tempo de história e local do tumor.....	29
Tabela 3	Número de porcentagem de pacientes segundo tabagismo, etilismo e local do tumor.....	30
Tabela 4	Número de porcentagem de pacientes segundo estadiamento e local do tumor.....	31
Tabela 5	Número de porcentagem de pacientes segundo a classificação histológica e local do tumor.....	31
Tabela 6	Número de porcentagem de pacientes segundo mandibulectomia, palatectomia, esvaziamento cervical, reconstrução e local do tumor.....	32
Tabela 7	Número de porcentagem de pacientes segundo esquema de tratamento e local do tumor.....	33
Tabela 8	Média da dose da radioterapia por localização dos tumores.....	34
Tabela 9	Número de porcentagem de pacientes segundo invasão sanguínea, invasão linfática, invasão perineural e local do tumor.....	34

Tabela 10	Número de porcentagem de pacientes segundo as proteínas PI3K, p-mTOR, p-Akt, p-MAPK e local do tumor.....	36
Tabela 11	Número de porcentagem de pacientes segundo a expressão citoplasmática ou nuclear da proteína PTEN.....	39
Tabela 12	Número de porcentagem de pacientes de acordo com o estatus do gene PTEN pelo FISH e local do tumor.....	41
Tabela 13	Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estágio e a expressão da proteína PI3K.....	43
Tabela 14	Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estágio e a proteína p-mTOR no citoplasma.....	44
Tabela 15	Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estágio e a proteína p-mTOR na membrana.....	44
Tabela 16	Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estágio e a proteína p-mTOR no núcleo.....	45
Tabela 17	Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estágio e a proteína p-MAPK no citoplasma.....	46
Tabela 18	Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estágio e a proteína p-MAPK no núcleo.....	46

Tabela 19	Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadio e a proteína p-Akt no citoplasma.....	47
Tabela 20	Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadio e a proteína p-Akt no núcleo.....	48
Tabela 21	Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadio e a proteína PTEN no citoplasma.....	49
Tabela 22	Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadio e a proteína PTEN no núcleo.....	49
Tabela 23	Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadio e a técnica de FISH do gene PTEN.....	50
Tabela 24	Probabilidade de sobrevida livre de doença acumulada após 5 anos.....	52
Tabela 25	Probabilidade de sobrevida global após 5 anos.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

DAB	do inglês: Diaminobenzidine
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
HE	Hematoxilina-Eosina
HPV	Papilomavírus humano
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
mTOR	do inglês: mammalian target of rapamycin
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline – Tampão salino de fosfato
PDK1	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PTEN	do inglês: Phosphatase and tensin homolog
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
TMA	Tissue Microarray
UICC	União Internacional Contra o Câncer

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Carcinoma de cavidade oral.....	1
1.2	Carcinoma de gengiva/rebordo alveolar	2
1.3	Carcinoma de palato duro	6
1.4	Alterações moleculares em carcinomas de cabeça e pescoço.....	7
1.4.1	Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.....	8
1.4.2	MAP cinases	10
1.4.3	PTEN.....	12
2	JUSTIFICATIVA.....	15
3	OBJETIVOS.....	16
3.1	Objetivo geral.....	16
3.2	Objetivos específicos	16
4	PACIENTES E MÉTODOS.....	18
4.1	Constituição da amostra	18
4.2	Metodologia	19
4.3	Análise histopatológica	19
4.4	Tissue microarray (TMA) e imunoistoquímica (IHQ).....	20
4.4.1	Forma de análise das reações imunoistoquímicas.....	22
4.5	FISH (Hibridização in situ fluorescente)	23
4.6	Variáveis de estudo	24
4.7	Análise dos resultados.....	25
4.8	Questões éticas	27
5	RESULTADOS.....	28
5.1	Descrição das características clínicas e histopatológicas.....	28

5.2	Descrição dos resultados dos marcadores imunoistoquímicos e de FISH e relação com o local do tumor.....	35
5.3	Associação dos dados da imunoistoquímica e FISH com as características clínicas e histopatológicas.....	42
5.4	Análises univariadas de sobrevida livre de doença em relação aos dados demográficos, clinicopatológicos e biomarcadores após 60 meses	50
5.5	Análises univariadas de sobrevida global em relação aos dados demográficos, clinicopatológicos e biomarcadores após 5 anos	56
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÕES	67
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	69

ANEXOS

Anexo 1 Ficha utilizada para a coleta de dados clínicos e microscópicos relativos ao pacientes com carcinoma epidermóide de gengiva, rebordo alveolar e palato duro

Anexo 2 Protocolo da técnica de Imunoistoquímica

Anexo 3 Protocolo da técnica de FISH

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DE CAVIDADE ORAL

O câncer de Cabeça e Pescoço corresponde ao sexto tumor mais comum no mundo, sendo o câncer de boca o quinto tipo em incidência. É muito freqüente na Ásia (Índia, Cingapura e outros países da região) representando nesta região mais de 50% de todos os diagnósticos de câncer (STUGIS 2004). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de cavidade oral é a quinta neoplasia mais comum entre os homens, sendo o quarto mais freqüente na região Nordeste (6/100 mil) e para as mulheres o oitavo mais freqüente na região Nordeste (3/100 mil). O INCA estima para o ano de 2012 cerca de 518.510 novos casos de câncer no Brasil. Do total, 14.170 (estimativa) serão da cavidade oral, sendo 9.990 em homens e 4.180 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 10 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou para o ano de 2030 uma incidência de 27 milhões de casos de câncer e esse aumento incidirá em países de baixa e média renda (Ministério da Saúde 2011).

O câncer de boca inclui os cânceres de lábio e os da cavidade oral (mucosa bucal, gengiva, palato duro, língua parte oral e soalho da boca) acometendo com maior freqüência indivíduos do sexo masculino após a 5ª década de vida, cujos fatores de risco, mais comumente associados e que possam ajudar no desenvolvimento dessa doença são: o tabaco e o álcool. Contudo, muitas pessoas que

fumam e ingerem bebida alcoólica não necessariamente irão desenvolver esse câncer. Outros fatores de risco também são referidos pela literatura como: exposição prolongada a radiações ultravioletas, infecções virais (principalmente pelo papilomavírus humano [HPV]) e hereditariedade (LEE et al. 2007; SUBA 2007; TOLMAN et al. 2007). O tipo histológico mais freqüente de carcinoma de boca é o carcinoma epidermóide que representa mais de 90% dos casos (KURATOMI et al. 2006). Em relação à topografia, 35% dos carcinomas epidermóides ocorrem no lábio inferior, 25% na língua, 20% no soalho bucal, 15% no palato mole, 4% na gengiva inserida, e 1% na mucosa jugal (KHAN et al. 2005).

O desenvolvimento desta doença está relacionado ao acúmulo de alterações genéticas, particularmente nos genes que regulam crescimento, diferenciação e morte celular, em genes que promovem estabilidade, reparo do DNA e imunidade celular e humoral (SCHOELCH et al. 1999; COLETTA et al. 2002).

O diagnóstico e o tratamento do câncer de boca são baseados no estadiamento clínico e dados clinicopatológicos, entretanto, tumores morfologicamente semelhantes e no mesmo estágio clínico podem apresentar comportamentos completamente distintos devido aos padrões de expressões gênicas diferentes (IRIÉ et al. 2004).

1.2 CARCINOMA DE GENGIVA/REBORDO ALVEOLAR

A gengiva pode ser considerada como uma unidade funcional e anatômica variável quanto à forma, contorno e localização clínica, ou seja, é a parte da mucosa bucal com função de revestir os processos alveolares e também as porções cervicais

dos dentes, revestindo os segmentos medianos e laterais tanto da mandíbula quanto das maxilas. A gengiva normal apresenta-se com coloração rósea e encontra-se separada apicalmente da mucosa alveolar, a qual geralmente é de coloração vermelho-escura. Essa separação se dá por uma linha mucogengival que pode ser mais ou menos evidente, dependendo da queratinização do tecido ou de sua pigmentação, e para ser considerada normal/saudável, deve apresentar clinicamente ≥ 2 mm de gengiva queratinizada. A gengiva divide-se em dois tipos; livre e inserida. A livre tem cor rósea, superfície opaca e consistência firme, localizada na porção coronal do tecido gengival das partes vestibular e lingual ou palatina dos dentes e na gengiva interdental ou papila interdental. A gengiva inserida estende-se desde a base do sulco gengival em direção apical até a junção mucogengival, fazendo limite com a mucosa alveolar de revestimento, apresenta-se com textura firme e coloração rósea (AINAMO e LÖE 1966; HASSELL 1993; WILSON 1996). O rebordo ósseo alveolar pode ser considerado como uma estrutura anatômica formada por duas lâminas ósseas relativamente delgadas e paralelas entre si que emergem do corpo da mandíbula e da maxila. Sua função é de alojar e suportar as raízes dentárias, denominando-se assim as arcadas edêntulas inferior e superior total ou parcialmente (diastemas, espaços, protéticos) (AVERY 1994).

O carcinoma epidermóide de gengiva acomete freqüentemente pacientes acima dos 66 anos de idade (SEOANE et al. 2006). Diversos estudos relatam aumento significativo da incidência deste carcinoma na população assim como a diminuição da diferença na proporção homem-mulher (BARASCH et al. 1995; LI et al. 2004; BINAHMED et al. 2007). São raros os relatos do acometimento deste carcinoma em idade pediátrica. BILL et al. (2001), BINAHMED et al. (2007) e

STOLK-LIEFFERINK et al. (2008) relataram o aparecimento de carcinoma epidermóide de gengiva em crianças de 14 anos, 10 anos e 11 anos respectivamente.

Os fatores de risco para o carcinoma de gengiva ainda são controversos, a maioria dos autores sugere a relação com o consumo excessivo de tabaco e álcool (SOO et al. 1988; BINAHMED et al. 2007). LI et al. (2004) relataram um caso de carcinoma de gengiva na região dos dentes 36 e 37 (1º e 2º molar inferior esquerdo respectivamente) em um paciente que fez uso de tabaco mascado por mais de 10 anos. O carcinoma epidermóide de gengiva afeta frequentemente a gengiva dos dentes inferiores (CADY e CATLIN 1970). SOO et al. (1988) revisaram os registros do Centro de Câncer do Memorial Sloan-Kettering (Nova Iorque) e encontraram 76% dos casos envolvendo também a gengiva inferior, sendo a localização mais comum o sulco gengivo-vestibular (TIWARI 2000).

O carcinoma epidermóide de gengiva tem uma forte predileção para invadir osso, especialmente quando localizado no alvéolo posterior e região retromolar. O padrão dessa infiltração e sua extensão são fatores importantes que devem ser analisados com cautela para que seja realizado um manejo correto do tratamento (HONG et al. 2001).

Existem algumas hipóteses em relação à invasão óssea da mandíbula por tumores, das quais BROWN (2003) mostra sete rotas possíveis para invasão: pela cavidade oral através da superfície superior da mandíbula (oclusal do dente); pelo forame mental; tumores secundários do pescoço através da borda inferior; pelo forame mandibular; defeito no osso cortical em pessoas edêntulas; tecido periodontal em pacientes dentados ou até mesmo através da gengiva inserida (HONG et al. 2001).

SEOANE et al. (2006) avaliaram consecutivamente 59 pacientes com câncer de boca. Destes, 12 pacientes apresentavam tumores de gengiva, um de palato duro e o restante em outras regiões. Os autores não encontraram diferenças entre tumores de gengiva e os demais em relação ao hábito (tabaco), atraso no diagnóstico e gênero. No entanto, os tumores de gengiva apresentavam-se em estágio clínico mais avançado, principalmente relacionado à rápida infiltração óssea. Os autores concluíram que os tumores de gengiva são diagnosticados numa fase clínica mais avançada, principalmente devido à rápida invasão óssea e não pelo atraso no diagnóstico e este fato se deve a proximidade dos carcinomas de gengiva com o tecido ósseo.

O prognóstico dos pacientes com carcinomas de gengiva dependerá do tipo histológico e extensão clínica do tumor. Histologicamente é importante determinar a diferenciação do tumor, sendo que tumores bem-diferenciados são associados ao melhor prognóstico. No entanto, o indicador prognóstico mais importante é o estadiamento clínico da doença, no qual, pacientes com tumores pequenos e localizados mostram sobrevida livre de doença no período de cinco anos em torno de 60-70%. Todavia, se houver ocorrência de metástases a sobrevida cai para 25%, portanto, o diagnóstico precoce da doença é fator importante para uma melhor qualidade de vida e tempo de sobrevida livre de doença (LI et al. 2004).

O estadiamento do carcinoma de gengiva segue os critérios estabelecidos pela União Internacional Contra o Câncer-UICC, sendo que de T1 a T3 a definição se dá de acordo com a invasão superficial do tumor, e T4 refere ao tumor que conseguiu invadir estruturas adjacentes (SOBIN et al. 2011). O tratamento consiste principalmente na cirurgia e radioterapia. NATHANSON et al. (1973), verificaram o

prognóstico do tumor através dos materiais coletados de pacientes tratados no período de 1958-1969 no Hospital Karolinska (Stocolmo), obtendo 20 pacientes que foram submetidos apenas à cirurgia, 73 submetidos à radioterapia (no qual 12 receberam apenas tratamento paliativo), 32 radioterapia e depois cirurgia, e observaram que pacientes que tiveram melhor resultado foram aqueles submetidos a cirurgia e que eram estadio I. Os pacientes em estadio II que tiveram melhor prognósticos foram aqueles submetidos à radioterapia e cirurgia.

1.3 CARCINOMA DE PALATO DURO

O palato duro é formado pelos dois processos palatinos da maxila e os dois ossos palatinos. É a porção anterior do palato que contém o esqueleto ósseo, por isso a denominação de palato duro. É unido anteriormente e lateralmente pelo processo alveolar e gengiva, e recoberto por uma mucosa firme, protegido por queratina (POTTER 1973; KIRSCH 2007).

O carcinoma epidermóide afetando o palato duro é raro, sendo o adenocarcinoma mais comum nessa topografia. EVANS e SHAH (1981) ao analisar pacientes com carcinoma epidermóide de palato, encontraram 190 pacientes com carcinoma epidermóide de palato mole e apenas 62 de palato duro. Da mesma forma, BINAHMED et al. (2008), encontraram o tipo epidermóide de palato duro em 11 pacientes dos 37 avaliados. O carcinoma epidermóide de palato acomete frequentemente pacientes do sexo masculino (2:1) na sétima década de vida (EVANS e SHAH 1981). YOROZU et al. (2001), estudando 31 casos, encontrou que a média de idade foi de 74 anos, sendo 58% homens e 42% mulheres. Para corroborar com os

achados destes autores, BINAHMED et al. (2008) encontraram a média de idade de 72.8 anos, porém 67% do sexo feminino, sendo que 50% dos pacientes tinham tabaco e álcool como fatores de risco.

O estadiamento segue os mesmos critérios de classificação do carcinoma de gengiva feito pela UICC (SOBIN et al. 2011). O tratamento consiste na cirurgia e radioterapia, todavia o controle local deve ser feito periodicamente (YOROZU et al. 2001), devido à capacidade de infiltração, semelhante ao carcinoma epidermóide de gengiva. De acordo com BINAHMED et al. (2008) tumores de gengiva e palato duro deveriam ser considerados do mesmo sítio, visto que, as duas áreas são adjacentes anatomicamente e dividem a mesma aparência clínica e de manejo. A sobrevida em cinco anos de acordo com EVANS e SHAH (1981), foi de 39% nos pacientes abaixo de 60 anos, e diminui conforme os estadios mais avançados da lesão, sendo sobrevida de 75% no estadio I e 11% no estadio IV. Da mesma forma, BINAHMED et al. (2008), encontraram que a sobrevida livre de doença foi de 82% em cinco anos para os tumores nos estadios I e II.

1.4 ALTERAÇÕES MOLECULARES EM CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO

Muitos estudos têm sido realizados com intuito de compreender a etiologia e patogênese do carcinoma epidermóide da boca, entretanto, os mecanismos moleculares e genéticos envolvidos nestes processos ainda não estão completamente esclarecidos (SCHOELCH et al. 1999; WILLIAMS 2000; SILVA et al. 2008).

1.4.1 Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR

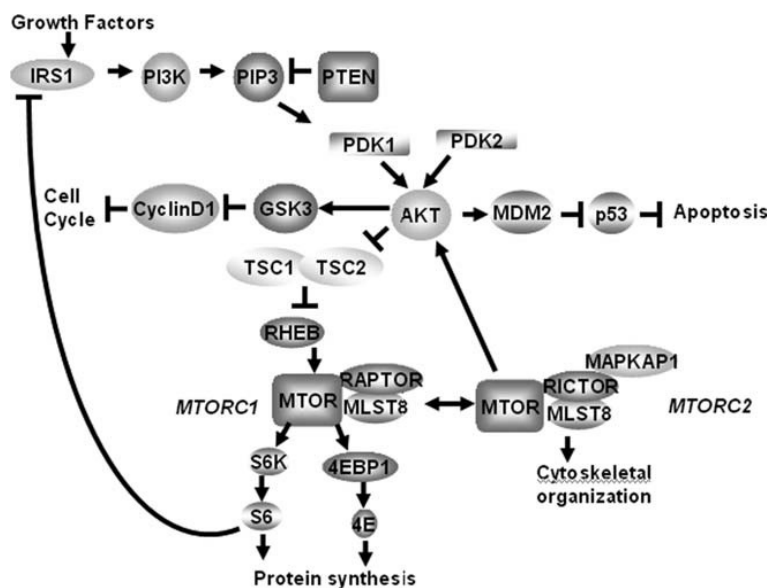
O início dos estudos a respeito da família de proteínas Akt deu-se quando dois genes (Akt 1 e 2) foram identificados como homólogos humanos do oncogene viral v-Akt, responsável pela leucemia em ratos (STAAL 1987). Por apresentar semelhanças com as proteínas kinases A (PKA) e C (PKC), é conhecida como proteína kinase B/Akt (PKB/Akt) e os membros da família chamados PKB α (Akt1), PKB β (Akt2) e PKB γ (Akt3) (BELLACOSA et al. 1991; NICHOLSON e ANDERSON 2002).

A proteína Akt é frequentemente ativada em muitas neoplasias malignas devido a amplificação ou mutações de genes que sinalizam sua ativação. Acredita-se que Akt promova a proliferação não coordenada e o aumento de sobrevivência celular, agindo, portanto na progressão do câncer (NICHOLSON e ANDERSON 2002). STAAL (1987) com o primeiro estudo a respeito da participação do Akt em neoplasias não detectou mutação ou alteração genética, mas uma superexpressão da proteína. Outros estudos que deram continuidade a essa investigação encontraram superexpressão protéica em diferentes formas do Akt (THOMPSON et al. 1996; NAKATANI et al. 1999).

A estrutura protéica da proteína Akt é formada por uma cadeia N-terminal, um domínio catalítico e uma cadeia C-terminal. Até o momento foram isolados três membros da família de Akt, Akt1, Akt2 e Akt3, os quais são codificados por diferentes genes, e possuem mais de 80% de similaridade entre suas cadeias de aminoácidos. Segundo NICHOLSON e ANDERSON (2002) a ativação da proteína Akt1 (fosforilação nos sites: Thr-308 e Ser-473) parece estar relacionada com a proliferação e progressão em diferentes tipos de neoplasias.

Para que ocorra a ativação de Akt é necessário que haja uma disponibilidade intracelular de PI3K (fosfatidilinositol-3 quinase), o qual através de sinais extracelulares será recrutado para a membrana plasmática e irá fosforilar um lipídeo PIP2, passando a PIP3, que é responsável pelo recrutamento do Akt e regulada negativamente pelo PTEN. Quando o Akt encontra-se na membrana plasmática, ele sofre fosforilações em diferentes sítios: PDK-1 (fosfatidilinositol quinase-dependente 1); PDK-2 (fosfatidilinositol quinase-dependente 2) (NICHOLSON e ANDERSON 2002) (Figura 1).

A mTOR (mammalian target of rapamycin) é uma serina/treonina quinase responsável pelo controle do crescimento e proliferação celular em resposta à disponibilidade de nutrientes e também à estimulação por fatores de crescimento (HARDING 2003). Segundo HAY e SONENBERG (2004), os alvos mais importantes do mTOR parecem ser a S6K1 (translational components ribosomal p70S6 kinase) e o 4E-BP1 [eukariotic initiation factor 4E (Eif4e)-binding protein 1]; enquanto a ativação de S6K1 aumenta a tradução do RNAm o qual contém TOP (5'-terminal oligopyrimidine tract), a fosforilação de 4E-BP permite a liberação de eIF4E o qual facilita a ligação do RNAm à subunidade ribossômica 40S. Portanto, desta forma, mTOR estimula a tradução protéica requerida para a progressão do ciclo celular. A ativação da via Akt/mTOR contribui para a carcinogênese induzindo a sobrevivência celular, proliferação e angiogênese em diferentes tipos de células; e também, a ativação dessa via ativará o eIF4E, que é superexpresso em tumores e considerado um fator preditor para recorrências (HUANG e HOUGHTON 2002; NATHAN et al. 2002; HUANG e HOUGHTON 2003; NATHAN et al. 2004).



Fonte: CLARK et al. (2010)

Figura 1 - Mecanismo de ativação e principais alvos envolvidos na via de sinalização das proteínas PI3K/Akt/mTOR

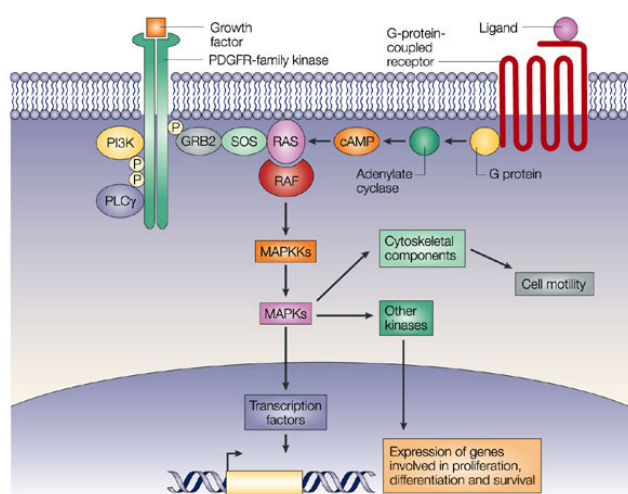
1.4.2 MAP cinases

Uma das principais vias de sinalização ativadas pelo mitógeno é a das proteínas cinases (MAPKs), envolvidas no controle de funções celular e conservada pelos eucariotos (KOLCH 2000).

A via da MAP cinase é formada por três proteínas: MAP cinase cinase cinase (MAPKKK) que fosforila ativando uma MAP cinase cinase (MAPKK) que também ativa por fosforilação a MAP cinase (MAPK). Cinco grupos de MAP cinases já foram identificados, sendo os mais estudados e pesquisados: a via das ERKs 1/2 (cinases ativadas por sinais extracelulares em resposta a fatores de crescimento e associada à proliferação e diferenciação celular), via da p38 MAPK e da JNK (cinase N-terminal e do c-Jun), estas duas últimas relacionam-se a estímulos de estresse (choque osmótico e estimulação por citocinas) (ENSLIN e DAVIS 2001; SACKS 2006).

A MAPKKK é chamada de Raf, a MAPKK chamada MEK e a MAPK chamada de ERK. A via das ERKs é uma via complexa formada por 3 isoformas de Raf: A-Raf, B-Raf e Raf-1; duas isoformas de MEK: MEK1 e MEK2; e duas isoformas de ERK: ERK1 e ERK2 (chamadas de p42 MAPK e p44 MAPK). A ativação da ERK pode desencadear proliferação celular, diferenciação e apoptose, pois ela é capaz de modular o funcionamento de proteínas alvo em diversas localizações celulares, tais como: núcleo, citoplasma, membrana e citoesqueleto (ROUX e BLENIS 2004) (Figura 2).

A interação desta via com a da PI3K/Akt/mTOR para alguns autores parece ser um fator determinante para a permissão da progressão do ciclo celular (MIRZA et al. 2004; CHAMBARD et al. 2007).



Nature Reviews | Cancer

Fonte: DIBB et al. (2004)

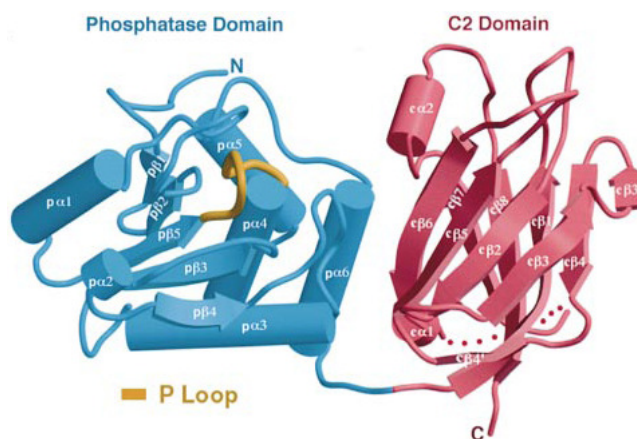
Figura 2 - Mecanismo de ativação e principais alvos envolvidos na via de sinalização das proteínas RAS-RAF-MAPK

1.4.3 PTEN

PTEN (**Phosphatase and Tensin Homologue**) é uma fosfatase homóloga a tensina, ou melhor, é uma fosfatase lipoprotéica responsável pelo ciclo celular e apoptose e também a aspectos relacionados à fisiologia da célula podendo incluir regulação da adesão celular, migração e diferenciação (DI CRISTOFANO e PANDOLFI 2000).

O gene é um supressor de tumor, localizado no cromossomo 10q23 e é conhecido como Mutated in multiple advanced cancers (MMAC1). A proteína PTEN é constituída por 403 aminoácidos e pertence à família das proteínas tirosino-fosfatases (PTP) (CANTLEY e NEEL 1999).

É formado por um domínio fosfatase N-terminal, um domínio C2 e uma região caudal C-terminal a qual contém múltiplos sítios de fosforilação (LEE et al. 1999) (Figura 3).



Fonte: LEE et al. (1999)

Figura 3 - Estrutura protéica da proteína PTEN

PTEN contém um domínio fosfatase tirosina protéica que tem características semelhantes às fosfatases de especificidade dual, capazes de desfosforilar tanto os resíduos serina e treonina, quanto os de tirosina. A unidade catalítica do PTEN é formada pelos domínios C2 e fosfatase, sendo que apenas com estes dois domínios ela tem a capacidade de metabolizar o PIP3 na membrana plasmática (LEE et al. 1999; VAZQUEZ e SELLERS 2000).

Segundo RAFTOPOULOU et al. (2004), a expressão somente do domínio C2 é capaz de suprimir a motilidade celular, mostrando portanto que além da supressão tumoral que a unidade catalítica da proteína proporciona, há um segundo mecanismo que encontra-se envolvido na motilidade celular, explicando a possível atividade de PTEN na supressão de metástases. Em relação ao domínio fosfatase, parece que uma das funções de sua atividade protéica é a desfosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina de peptídeos fosforilados envolvidos na regulação da adesão (MYERS e TONKS 1997; TAMURA et al. 1998). Quando a expressão de PTEN intracelular está aumentada, há a desfosforilação da quinase de adesão focal (FAK) e o domínio protéico Shc, diminuindo assim a disseminação e a motilidade celulares (TAMURA et al. 1998; GU et al. 1999).

O gene PTEN é silenciado em neoplasias malignas devido a mutações ou deleções, os quais levam à ativação constitutiva de Akt e à regulação positiva do mTOR (CANTLEY e NEEL 1999).

No ano de 1997 foram descobertas alterações genéticas e protéicas da proteína PTEN em diversas neoplasias, por exemplo: próstata, cérebro, mama, endométrio, pele e rim (LI et al. 1997; STECK et al. 1997). Contudo, estudos sobre a

proteína PTEN na carcinogênese do carcinoma epidermóide de boca ainda são escassos e controversos (MAVROS et al. 2002; SQUARIZE et al. 2002).

O principal substrato *in vivo* de PTEN é o fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) presente na membrana celular (LEE et al. 1999). A presença da proteína PTEN mantém os níveis de PIP3 baixos, enquanto sua ausência promove o aumento da concentração de PIP3 e da sinalização de PI3K/Akt, promovendo a progressão não coordenada do ciclo celular, migração celular e a viabilidade de metástases através da inibição de vários estímulos apoptóticos (DI CRISTOFANO e PANDOLFI 2000).

A proteína PTEN é uma supressora de tumor e moduladora intracelular da proteína Akt. Quando fosforilada, a Akt bloqueia inúmeras proteínas apoptóticas e a GSK-3 (indispensável para a degradação da β -catenina e Ciclina D1); também ativa proteínas anti-apoptóticas e a quinase mTOR (mammalian target of Rapamycin), cuja função é estimular a tradução de proteínas responsáveis, entre outras funções, pela progressão celular da Fase G1 para a Fase S.

Diversas linhas de pesquisa evidenciam que a ausência de PTEN encontra-se envolvida na ativação do proto-oncogene Akt em neoplasias malignas; sendo que sua ativação irá depender da disponibilidade intracelular do PI3K (fosfatidilinositol-3 quinase). Através de sinais extracelulares, esta molécula é recrutada para a membrana plasmática onde fosforila o lipídeo PIP2, passando a PIP3. Uma vez na membrana plasmática Akt sofre fosforilações em diferentes sítios por PDK-1 (fosfatidilinositol quinase-dependente 1) e ILK (quinase ligada a integrina) (TESTA e BELLACOSA 2001; NICHOLSON e ANDERSON 2002).

2 JUSTIFICATIVA

A gengiva/rebordo alveolar e o palato duro são mucosas queratinizadas, e a maioria dos carcinomas epidermóides intraorais são originados da mucosa não-queratinizada da língua e soalho bucal, e, estão associados aos fatores de risco tabaco e álcool. Nossa proposta consistiu na análise das características clínicas, histopatológicas e expressões imunoistoquímicas das proteínas associadas à via do PI3K/Akt/mTOR, PTEN e MAPK em carcinomas da gengiva, rebordo alveolar e palato duro no período de janeiro de 1980 a dezembro de 2006, na tentativa de estabelecer possíveis fatores prognósticos associados a estes tumores.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características clínicas, histopatológicas e expressões imunoistoquímicas das proteínas associadas à via do PI3K/Akt/mTOR, PTEN e MAPK em carcinomas da gengiva, rebordo alveolar e palato duro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características clínicas e histopatológicas dos carcinomas epidermóides de gengiva, rebordo alveolar e palato duro;
- Descrever o padrão de expressão de proteínas PI3K, Akt, mTOR, PTEN e MAPK nos carcinomas epidermóides de boca (gengiva, rebordo alveolar e palato duro);
- Determinar o estatus do gene PTEN nos carcinomas epidermóides de boca (gengiva, rebordo alveolar e palato duro) através da hibridização in situ fluorescente (FISH);
- Analisar a associação dos dados obtidos por imunoistoquímica e FISH com as características clínicas e histopatológicas dos carcinomas epidermóides de boca (gengiva, rebordo alveolar e palato duro);

- Estimar as taxas de sobrevida global e livre de doença segundo as variáveis: sexo, idade, tabagismo, etilismo, grau histológico do tumor primário, estágio clínico, marcadores imunoistoquímicos e estatus do PTEN por FISH.

4 PACIENTES E MÉTODOS

Foi realizado um estudo de coorte retrospectivo.

4.1 CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA

Incluíram-se neste estudo os pacientes admitidos no Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A.C. Camargo, diagnosticados com carcinoma epidermóide de gengiva, rebordo alveolar e palato duro no período de janeiro de 1980 a dezembro de 2006 e atendidos no Departamento de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia. Consideraram-se como critérios de inclusão os pacientes tratados nesta Instituição com tumor primário diagnosticados como carcinoma epidermóide, confirmado através de exames anatomopatológicos, localizados em gengiva, rebordo alveolar e palato duro.

Foram excluídos os casos sem disponibilidade ou material insuficiente dos blocos de parafina dos referidos tumores para confirmação histopatológica e realização da imunoistoquímica e/ou FISH. Os pacientes tratados previamente ou com tumores primários múltiplos metastáticos também foram excluídos da amostra.

Inicialmente, foram selecionados os registros de 261 pacientes para o estudo; contudo após a avaliação dos prontuários e seleção dos blocos de parafina para a realização de novos cortes histológicos, a amostra final foi constituída por 125 pacientes.

4.2 METODOLOGIA

A coleta de dados nos prontuários teve como objetivo obter informações sócio-demográficas e terapêuticas, assim como dados dos tratamentos realizados, achados anatomopatológicos e evolução clínica dos pacientes.

As informações clínicas, identificação e os dados demográficos dos pacientes (idade, gênero), hábitos (fumo e consumo de álcool), informações relativas ao exame locorregional e informações do ato cirúrgico e peça cirúrgica foram registradas em ficha própria padronizada para o Estudo (Anexo 1). A revisão de prontuários foi realizada após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa juntamente ao Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) desta Instituição e os dados obtidos e organizados em um banco de dados, utilizando o programa Microsoft Excel 2007.

4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A partir do material existente nos blocos de parafina, novos cortes com 5µm corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) foram realizados para revisão do diagnóstico histopatológico e seleção das áreas tumorais para confecção do *Tissue Microarray* (TMA).

Avaliaram-se os dados histopatológicos: grau histológico, embolização vascular e linfática, infiltração perineural. O grau histológico foi determinado de acordo com ANNEROTH et al. (1987), sendo os tumores classificados em bem diferenciado (grau I), moderadamente diferenciado (grau II) e pouco diferenciado (grau III). Considerou-se como embolização vascular ou linfática a presença de

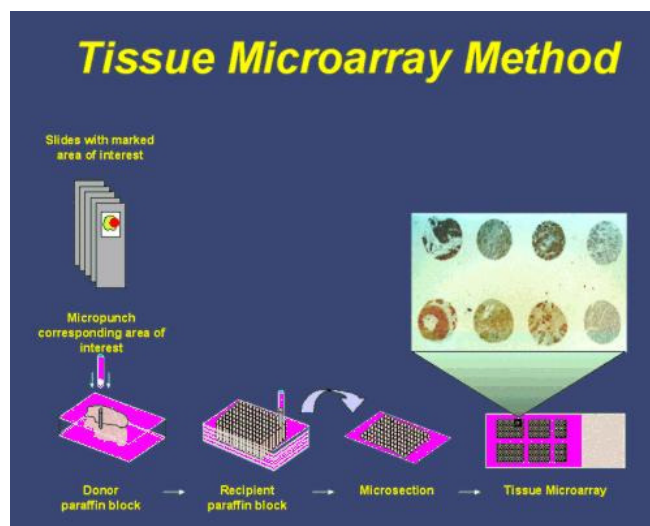
células neoplásicas encontradas em ambas as paredes e na luz dos vasos linfáticos ou sanguíneos; a infiltração perineural foi detectada quando os tecidos adjacentes aos nervos peri e/ou intra-tumorais estiveram envolvidos por células do tumor.

4.4 TISSUE MICROARRAY (TMA) E IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ)

Após a revisão anatomopatológica, com confirmação diagnóstica e presença dos blocos de parafina contendo fragmentos tumorais suficientes, selecionaram-se as áreas de interesse de cada caso.

O *tissue microarray* (TMA) contendo as amostras tumorais foi construído utilizando-se a aparelhagem disponível no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo – *tissue microarrayer* (*Beencher Instruments®*, Silver Spring, EUA). Foram selecionamos duas áreas distintas que representavam de forma qualitativa e quantitativa os tumores. Os blocos de parafina (doadores) destes casos foi puncionado em duas regiões diferentes em forma de cilindro com uma agulha de 1mm de diâmetro e transferidos de maneira organizada para o bloco receptor. Após a inserção de todos os casos, este bloco (receptor) foi submetido à microtomia e os cortes dispostos em lâminas de 5µm para a realização das reações imunoistoquímicas (IHQ) e de FISH (Figura 4).

As reações de IHQ foram realizadas em 2 lâminas dos cortes obtidos do bloco de TMA. A técnica baseou-se na utilização do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (*StreptABC*, *DAKO®*) com protocolo de recuperação antigênica conforme a padronização de cada anticorpo estabelecida no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo (Anexo 2) (Quadro 1).



Fonte: Sunnybrook Research Institute (2012)

Figura 4 - Imagem esquemática do processo de preparação dos blocos receptores e das lâminas do TMA

Quadro 1 - Anticorpos, clones, diluições e controles positivos usados na imunoistoquímica

Anticorpos	Clones	Diluição	Fabricantes/Códigos	Controle +
mTOR (phospho)	49F9	1:100	Cell-Signaling cod. 2976	Mama normal
PI3K	policlonal	Pronto para uso	Abcam ab82162-7	Placenta
MAPK p44/42 (phospho)	D13.14.45	1:50	Cell-Signaling cod. 4370S	Mama normal
PTEN	6H2.1	1:500	Cascade cod.ABM 2052	Tireóide normal
AKT (phospho)	587F11	1:25	Cell-Signaling cod. 4051L	Tumor de Cólon

4.4.1 Forma de análise das reações imunoistoquímicas

As lâminas das reações imunoistoquímicas de todos os anticorpos pesquisados foram avaliadas em microscópio óptico comum e as expressões avaliadas por dois observadores de maneira independente. Os casos discordantes foram discutidos em análise conjunta em microscópio de dupla observação. As expressões das proteínas PI3K, p-mTOR, p-MAPK, p-Akt e PTEN foram identificadas pela presença da coloração acastanhada nas células tumorais. Para os anticorpos PI3K, p-mTOR e p-MAPK os casos foram categorizados de acordo com a frequência (10%) e intensidade (fraca ou forte) de marcação das células neoplásicas:

0. **Negativo:** quando não há marcação de células neoplásicas ou marcação fraca em menos de 10% das células neoplásicas;
1. **Positivo fraco:** quando há positividade de intensidade fraca observada em mais de 10% das células neoplásicas;
2. **Positivo forte:** quando há positividade de forte intensidade observada em mais de 10% das células neoplásicas;
3. **Não avaliável:** quando não há representação tumoral na amostra.

Para o anticorpo p-AKT os casos foram categorizados de acordo com a frequência (10%) e intensidade (fraca, moderada ou forte) de marcação das células neoplásicas:

0. **negativo:** quando não há marcação de células neoplásicas;
1. **positivo fraco:** quando há positividade de intensidade fraca observada em mais de 10% das células neoplásicas;

2. **positivo moderado:** quando há positividade de moderada intensidade observada em mais de 10% das células neoplásicas;
3. **positivo forte:** quando há positividade de forte intensidade observada em mais de 10% das células neoplásicas;
4. **não avaliável:** quando não há representação tumoral na amostra

Para o anticorpo PTEN os casos foram categorizados de acordo com a intensidade e porcentagem das células neoplásicas marcadas:

0. **negativo:** quando não há marcação de células neoplásicas ou marcação fraca em menos de 10% das células neoplásicas;
1. **positivo fraco:** quando há positividade de intensidade fraca observada em mais de 10% das células neoplásicas;
2. **positivo forte:** quando há positividade de forte intensidade observada em mais de 10% das células neoplásicas;
3. **não avaliável:** quando não há representação tumoral na amostra.

4.5 FISH (HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE)

O FISH foi realizado seguindo as recomendações do fabricante, utilizando o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Anatomia Patológica, Hospital A.C. Camargo (Anexo 3).

As análises das lâminas do FISH foram realizadas em microscópio de fluorescência com os filtros adequados de acordo com o corante utilizado. Utilizamos os critérios descritos por RAZIS et al. (2008).

Foram contados os sinais em vermelho que representam o gene PTEN e os sinais em verde que representam o cromossomo 10 e determinadas as médias das razões PTEN/CEP10. Os valores de corte para cada sonda foram determinados utilizando o percentual médio de sinais de sonda obtido a partir de 60 células por caso. Os casos foram considerados normais (diplóides) quando a relação do gene/cromossomo em cada caso foi de 1 ou mais. Os casos com valores da relação gene/cromossomo abaixo de 1 foram considerados como deleção do gene.

4.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

- Características sócio-demográficas
 - Idade
 - Gênero: feminino ou masculino
 - Tabagismo: sim ou não
 - Etilismo: sim ou não
- Características clínicas
 - Tempo de história
 - Local do tumor: gengiva, palato duro e rebordo alveolar
 - Estadiamento clínico: I e II ou III e IV (TNM)
- Características anatomopatológicas e de tratamento
 - Sequência de tratamento: cirurgia, Rxt, Qt
 - Mandibulectomia: sim ou não
 - Palatectomia: sim ou não
 - Esvaziamento cervical: sim ou não

- Reconstrução: sim ou não
- Grau histológico do tumor primário: CEC I/CEC II e III
- Dose da radioterapia
- Resultados da Imunoistoquímica
 - PI3K: negativo ou positivo
 - pmTOR citoplasma: negativo ou positivo
 - pmTOR membrana: negativo ou positivo
 - mTOR núcleo: negativo ou positivo
 - pMAPK citoplasma: negativo ou positivo
 - pMAPK núcleo: negativo ou positivo
 - pAKT citoplasma: negativo ou positivo
 - pAKT núcleo: negativo ou positivo
 - PTEN citoplasma: negativo ou positivo
 - PTEN núcleo: negativo ou positivo
- Evolução
 - Recidiva/metástase
 - Situação da última informação

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A descrição da casuística foi feita através de médias e porcentagens.

A análise da associação entre as características sócio-demográficas, clínicas, anatomopatológicas e tratamento segundo local do tumor foi realizada pelo teste de associação pelo qui-quadrado. Este teste também foi usado na análise dos resultados

da imunoistoquímica e do FISH com as características demográficas e clinicopatológicas.

A análise da sobrevida livre de doença, cujo período de seguimento corresponde ao tempo decorrido entre a data do início do tratamento e ocorrência de recidiva local, regional ou à distância (metástases), foi feita através do método de Kaplan-Meier. A análise da sobrevida global, cujo tempo de seguimento corresponde ao período decorrido entre a data do início do tratamento e o óbito do paciente ou data do início do tratamento até a data da última informação objetiva, também foi calculada através do método de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas de sobrevida livre de doença e de sobrevida global, de acordo com as variáveis estudadas (informações clínicas, histopatológicas, imunoistoquímicas e moleculares), foi realizada através do teste de log-rank. O nível descritivo adotado para a significância de todas as análises estatísticas foi $p < 0,05$.

Todas as análises foram realizadas pelo software SPSS para Windows versão 15.0.

4.8 QUESTÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer A.C. Camargo, número 1487/10. A coleta de dados se deu através de prontuários e, por isso, não há termo de consentimento livre e esclarecido. Manter-se-á total sigilo dos nomes dos pacientes incluídos no estudo.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS

O grupo de estudo foi composto de 125 pacientes. A maioria dos tumores (35%) localizou-se no rebordo alveolar inferior, 25% em palato duro, 17% em gengiva inferior, 15% em rebordo alveolar superior e 8% em gengiva superior.

A idade dos pacientes variou de 30 a 91 anos com uma média de 65 anos. No grupo de pacientes com idade entre 30-59 anos, observou-se o predomínio de lesões localizadas em gengiva, e no grupo de pacientes com idade de 70-91 anos o tumor estava localizado predominantemente no palato duro e rebordo alveolar. Quanto ao gênero, 76 pacientes eram do sexo masculino e 49 do feminino, sendo que a proporção total de diagnóstico homem/mulher no período estudado foi de aproximadamente 2:1.

Na Tabela 1, observa-se que não houve associação estatisticamente significativa entre o local do tumor e a idade ($p=0,062$), mas houve diferença estatisticamente significativa em relação ao local do tumor e o gênero ($p=0,002$), sendo observado predomínio de tumores de gengiva e palato duro nos homens e tumores de rebordo alveolar nas mulheres.

Tabela 1 - Número de porcentagem de pacientes segundo idade, sexo e local do tumor

Variável	Categoria	LOCAL DO TUMOR			Total	p*
		Gengiva	Palato duro	Rebordo alveolar		
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)		
Idade	30-59 anos	17 (53,1)	11 (35,5)	15 (24,2)	43 (34,4)	0,062
	60-69 anos	9 (28,1)	8 (25,8)	22 (35,5)	39 (31,2)	
	70-91 anos	6 (18,8)	12 (38,7)	25 (40,3)	43 (34,4)	
Gênero	Masculino	27 (84,4)	20 (64,5)	29 (46,8)	76 (60,8)	0,002
	Feminino	5 (15,6)	11 (35,5)	33 (53,2)	49 (39,2)	
Total		32 (100,0)	31 (100,0)	62 (100,0)	125 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

Dos 125 pacientes estudados conseguimos obter o tempo de história da doença de 115 pacientes. Na Tabela 2 pode-se observar que não houve diferenças significativas entre o tempo de história da doença e a localização do tumor.

Tabela 2 - Número de porcentagem de pacientes segundo tempo de história e local do tumor

Tempo de história	LOCAL DO TUMOR			Total	p*
	Gengiva	Palato duro	Rebordo alveolar		
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)		
1-3 meses	6 (21,4)	8 (27,6)	28 (48,3)	42 (36,5)	0,109
4-7 meses	12 (42,9)	11 (37,9)	14 (24,1)	37 (32,2)	
8 meses ou mais	10 (35,7)	10 (34,5)	16 (27,6)	36 (31,3)	
Total	28 (100,0)	29 (100,0)	58 (100,0)	115 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

Na Tabela 3 observamos que a maioria dos pacientes era tabagista e não etilista, correspondendo a 67,8% e 61,7%, respectivamente. Observamos associação estatisticamente significativa entre tabagismo e localização do tumor. Dentre as localizações estudadas, os tumores de palato duro estavam mais frequentemente associados ao tabagismo ($p=0,010$). Em relação ao etilismo não houve diferença estatisticamente significativa em relação às localizações do tumor ($p=0,779$).

Tabela 3 - Número de porcentagem de pacientes segundo tabagismo, etilismo e local do tumor

Variável	Categoria	LOCAL DO TUMOR			Total	p*
		Gengiva	Palato duro	Rebordo alveolar		
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)		
Tabagismo	Não	12 (37,5)	2 (7,7)	23 (40,4)	37 (32,2)	0,010
	Sim	20 (62,5)	24 (92,3)	34 (59,6)	78 (67,8)	
Etilismo	Não	19 (59,4)	15 (57,7)	37 (64,9)	71 (61,7)	0,779
	Sim	13 (40,6)	11 (42,3)	20 (35,1)	44 (38,3)	
Total		32 (100,0)	26 (100,0)	57 (100,0)	115 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

A Tabela 4 mostra os subgrupos de estadiamento clínico dos pacientes. Devido ao pequeno número de pacientes em cada classe do estadiamento, decidimos para as análises estatísticas agrupá-los em 2 subgrupos (estádios I+II e III+IV). Pacientes com estadio I+II corresponderam a 16,8% e 83,2% eram do estágio III+IV. Observou-se que não houve associação estatisticamente significativa entre o estágio clínico e a localização do tumor ($p=0,196$).

Tabela 4 - Número de porcentagem de pacientes segundo estadiamento e local do tumor

Estadio	LOCAL DO TUMOR			Total	p*
	Gengiva	Palato duro	Rebordo alveolar		
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
I+II	7 (21,9)	2 (6,5)	12 (19,4)	21 (16,8)	0,196
III+IV	25 (78,1)	29 (93,5)	50 (80,6)	104 (83,2)	
Total	32 (100,0)	31 (100,0)	62 (100,0)	125 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

Ao relacionar a classificação histológica com o local do tumor, pode-se perceber na Tabela 5 que embora sem associação estatisticamente significativa ($p=0,546$) a maioria (79,8%) do casos foi classificada como carcinomas epidermóides bem diferenciados (CEC I).

Tabela 5 - Número de porcentagem de pacientes segundo a classificação histológica e local do tumor

Histologia do tumor primário	LOCAL DO TUMOR			Total	p*
	Gengiva	Palato duro	Rebordo alveolar		
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	(%)
CEC I	25 (78,1)	23 (74,2)	51 (83,6)	99 (79,8)	0,546
CEC II e III	7 (21,9)	8 (25,8)	10 (16,4)	25 (20,2)	
Total	32 (100,0)	31 (100,0)	61 (100,0)	124 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

Em relação ao tipo de cirurgia realizada para o tratamento, percebe-se na Tabela 6, que dos 125 casos estudados, a mandibulectomia foi realizada em 43,2% dos casos e palatectomia em 30,4%. 52,8% dos casos foram submetidos a esvaziamento cervical e 56,8% a algum tipo de reconstrução. Observa-se que houve associação estatisticamente significativa entre todas as modalidades cirúrgicas e o local do tumor. Nos pacientes com tumor de gengiva ou rebordo alveolar a mandibulectomia foi realizada em 50% e 61,3%, dos casos, respectivamente ($p < 0,001$). A palatectomia foi realizada mais frequentemente nos tumores de palato duro ($p = 0,002$). Os tumores localizados na gengiva e rebordo alveolar também mostraram associação com a realização de esvaziamento cervical e reconstrução ($p < 0,001$ e $p = 0,006$).

Tabela 6 - Número de porcentagem de pacientes segundo mandibulectomia, palatectomia, esvaziamento cervical, reconstrução e local do tumor

Variável	Categoria	LOCAL DO TUMOR			Total	p*
		Gengiva	Palato duro	Rebordo alveolar		
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)		
Mandibulectomia	Não	16 (50,0)	31 (100,0)	24 (38,7)	71 (56,8)	<0,001
	Sim	16 (50,0)	0 (0,0)	38 (61,3)	54 (43,2)	
Palatectomia	Não	25 (78,1)	15 (48,4)	47 (75,8)	87 (69,6)	0,012
	Sim	7 (21,9)	16 (51,6)	15 (24,2)	38 (30,4)	
Esvaziamento Cervical	Não	14 (43,8)	25 (80,6)	20 (32,3)	59 (47,2)	<0,001
	Sim	18 (56,3)	6 (19,4)	42 (67,7)	66 (52,8)	
Reconstrução	Não	11 (34,4)	21 (67,7)	22 (35,5)	54 (43,2)	0,006
	Sim	21 (65,6)	10 (32,3)	40 (64,5)	71 (56,8)	
Total		32 (100,0)	31 (100,0)	62 (100,0)	125 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

Os valores referentes ao esquema de tratamento realizado e o local do tumor são demonstrados na Tabela 7. A maioria dos casos foi submetida a alguma modalidade de tratamento, seja cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia, isolados ou associados.

Tabela 7 - Número de porcentagem de pacientes segundo esquema de tratamento e local do tumor

Sequência tratamento	LOCAL DO TUMOR			Total
	Gengiva	Palato duro	Rebordo alveolar	
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Não tratados	4 (12,5)	2 (6,5)	5 (8,1)	11 (8,8)
Cirurgia isolada	7 (21,9)	5 (16,1)	22 (35,5)	34 (27,2)
Rxt isolada	4 (12,5)	8 (25,8)	5 (8,1)	17 (13,6)
Cirurgia+Rxt	12 (37,5)	12 (38,7)	25 (40,3)	49 (39,2)
Cirurgia+Qt	0 (0,0)	1 (3,2)	1 (1,6)	2 (1,6)
Rxt+Qt	0 (0,0)	3 (9,7)	0 (0,0)	3 (2,4)
Cirurgia+Rxt+Qt	5 (15,6)	0 (0,0)	4 (6,5)	9 (7,2)
Total	32 (100,0)	31 (100,0)	62 (100,0)	125 (100,0)

A média da dose total da radioterapia recebida pelos pacientes foi de 5781,41 cGy (Tabela 8).

Tabela 8 - Média da dose da radioterapia por localização dos tumores

Local do Tumor	Média da dose da Radioterapia (cGy)
Gengiva	5621,43
Palato duro	5650,43
Rebordo alveolar	5968,82
Total	5781,41

A Tabela 9 mostra resultados das variáveis anátomo-patológicas (invasões sanguínea, linfática e perineural); todavia não foi feito teste estatístico, pois se obteve informações de apenas 74 pacientes. Apenas 6 pacientes tiveram invasão sanguínea, sendo que o local com maior porcentagem de invasão foi o rebordo alveolar com 12%. A invasão linfática foi observada em 25 pacientes, sendo o rebordo alveolar com maior porcentagem (31,7%). Observou-se em 27 pacientes a invasão perineural e também com maior porcentagem no rebordo alveolar (36,6%).

Tabela 9 - Número de porcentagem de pacientes segundo invasão sanguínea, invasão linfática, invasão perineural e local do tumor

Variável	Categoria	LOCAL DO TUMOR			Total
		Gengiva	Palato duro	Rebordo alveolar	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
Invasão sanguínea	Não	21 (100)	11 (91,7)	36 (87,8)	68 (91,9)
	Sim	0 (0,0)	1 (8,3)	5 (12,2)	6 (8,1)
Invasão linfática	Não	16 (76,2)	5 (41,7)	28 (68,3)	49 (66,2)
	Sim	5 (23,8)	7 (58,3)	13 (31,7)	25 (33,8)
Invasão perineural	Não	13 (61,9)	8 (66,7)	26 (63,4)	47 (63,5)
	Sim	8 (38,1)	4 (33,3)	15 (36,6)	27 (36,5)
Total		21 (100,0)	12 (100,0)	41 (100,0)	74 (100,0)

5.2 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS E DE FISH E RELAÇÃO COM O LOCAL DO TUMOR

O total de casos estudados variou para cada marcador pesquisado, sendo 119 casos para as proteínas PI3K e p-mTOR, 120 para as proteínas p-MAPK, p-Akt e PTEN. 84 casos foram avaliados por FISH para a determinação do status de PTEN.

A marcação da proteína PI3K foi observada somente no citoplasma na maioria das células neoplásicas (92,4%), sendo este padrão observado homogeneamente nos tumores das diversas localizações (Figura 5). A expressão da proteína p-mTOR foi observada no citoplasma, membrana e núcleo das células sendo observada na maioria dos casos a positividade no citoplasma (88,2%). A Figura 6 mostra um exemplo de positividade citoplasmática para p-mTOR. Para este marcador, observamos um predomínio de marcação na membrana celular dos tumores localizados na gengiva (50%) e rebordo alveolar (50,8%), enquanto que a marcação nuclear foi predominantemente encontrada nos tumores localizados no palato duro (56,7%), embora estes achados não tenham mostrado associações estatisticamente significativas (respectivamente $p=0,949$, $0,485$, $0,075$ e $0,164$). A proteína p-Akt foi expressa no citoplasma e núcleo (94,2% e 64,2% respectivamente), sendo observada marcação citoplasmática em mais de 90% dos casos em todas as localizações (Figura 7). A expressão da proteína p-MAPK foi observada no citoplasma e núcleo das células tumorais (88,3% e 58,3%, respectivamente, Figura 8). Os tumores não mostraram associações estatisticamente significativas em relação à expressão de p-MAPK citoplasma ou núcleo e a

localização tumoral (respectivamente $p=0,483$ e $p=0,539$). Todos estes dados estão na Tabela 10.

Tabela 10 - Número de porcentagem de pacientes segundo as proteínas PI3K, p-mTOR, p-Akt, p-MAPK e local do tumor

Variável	Categoria	LOCAL DO TUMOR			Total	p*
		Gengiva	Palato duro	Rebordo alveolar		
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
PI3K	Negativo	2 (6,7)	2 (6,9)	5 (8,3)	9 (7,6)	0,949
	Positivo	28 (93,3)	27 (93,1)	55 (91,7)	110 (92,4)	
p-mTOR citoplasma	Negativo	2 (6,7)	5 (16,7)	7 (11,9)	14 (11,8)	0,485
	Positivo	28 (93,3)	25 (83,3)	52 (88,1)	105 (88,2)	
p-mTOR membrana	Negativo	15 (50,0)	22 (73,3)	29 (49,2)	66 (55,5)	0,075
	Positivo	15 (50,0)	8 (26,7)	30 (50,8)	53 (44,5)	
p-mTOR núcleo	Negativo	17 (56,7)	13 (43,3)	38 (64,4)	68 (57,1)	0,164
	Positivo	13 (43,3)	17 (56,7)	21 (35,6)	51 (42,9)	
p-Akt citoplasma	Negativo	2 (6,7)	0 (0,0)	5 (8,3)	7 (5,8)	0,275
	Positivo	28 (93,3)	30 (100,0)	55 (91,7)	113 (94,2)	
p-Akt núcleo	Negativo	12 (40,0)	10 (33,3)	21 (35,0)	43 (35,8)	0,850
	Positivo	18 (60,0)	20 (66,7)	39 (65,0)	77 (64,2)	
p-MAPK citoplasma	Negativo	2 (6,7)	3 (10,0)	9 (15,0)	14 (11,7)	0,483
	Positivo	28 (93,3)	27 (90,0)	51 (85,0)	106 (88,3)	
p-MAPK núcleo	Negativo	11 (36,7)	15 (50,0)	24 (40,0)	50 (41,7)	0,539
	Positivo	19 (63,3)	15 (50,0)	36 (60,0)	70 (58,3)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

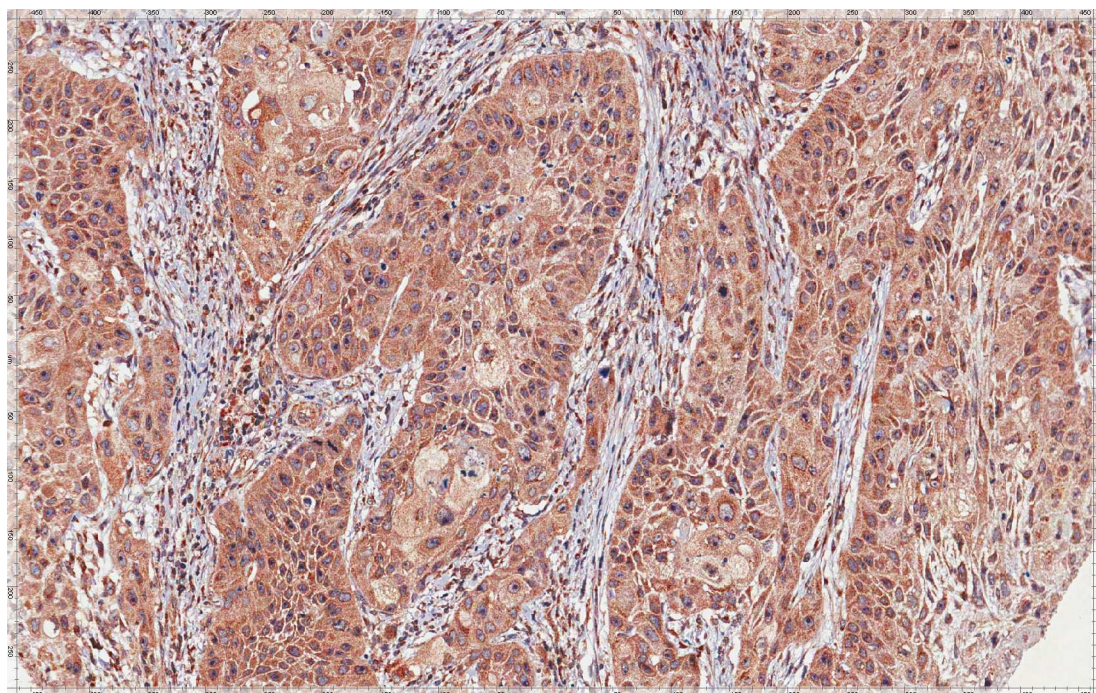


Figura 5 - Carcinoma epidermóide em rebordo alveolar inferior com marcação citoplasmática para PI3K (tamanho original 18.0x)

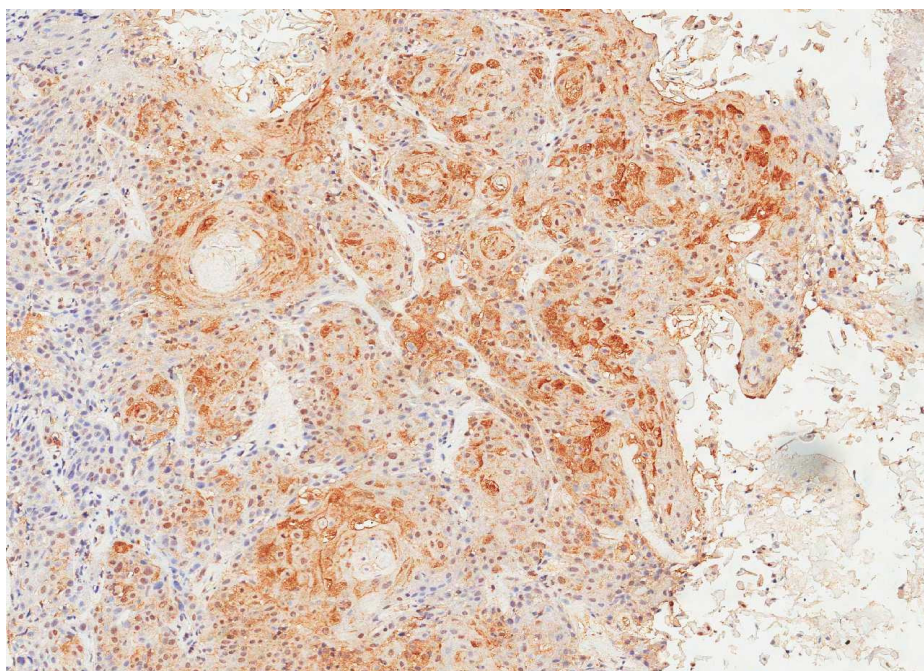


Figura 6 - Carcinoma epidermóide em rebordo alveolar superior com marcação citoplasmática de p-mTOR (tamanho original 11.0x)

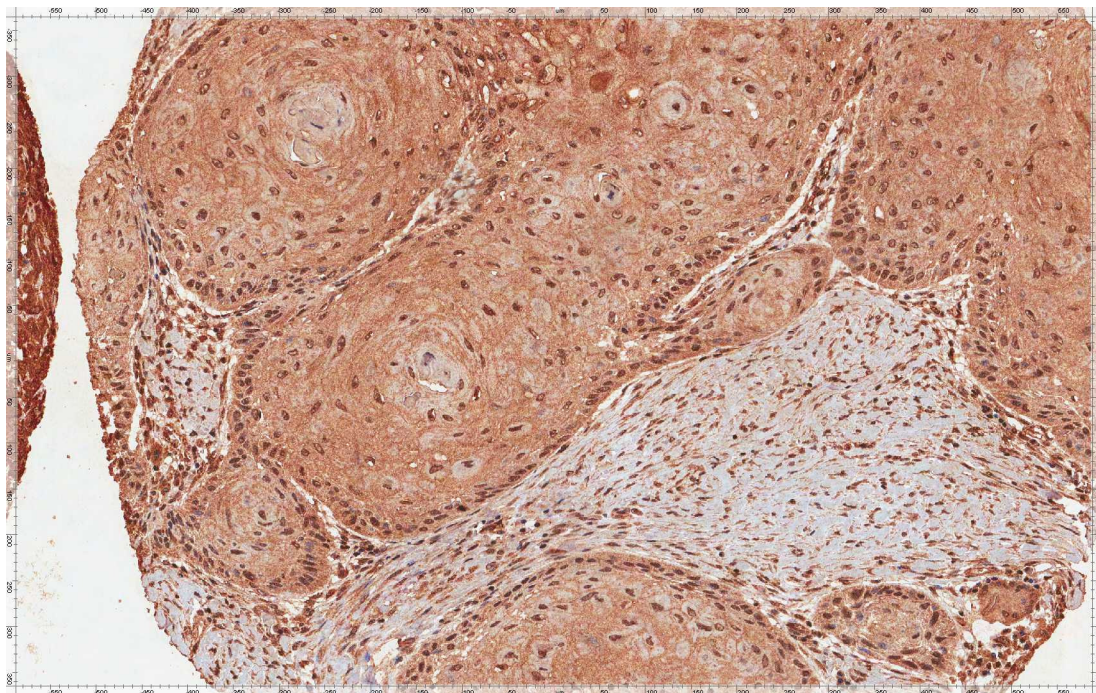


Figura 7 - Carcinoma epidermóide em rebordo alveolar superior com marcação citoplasmática e nuclear de p-Akt (tamanho original 14.4x)

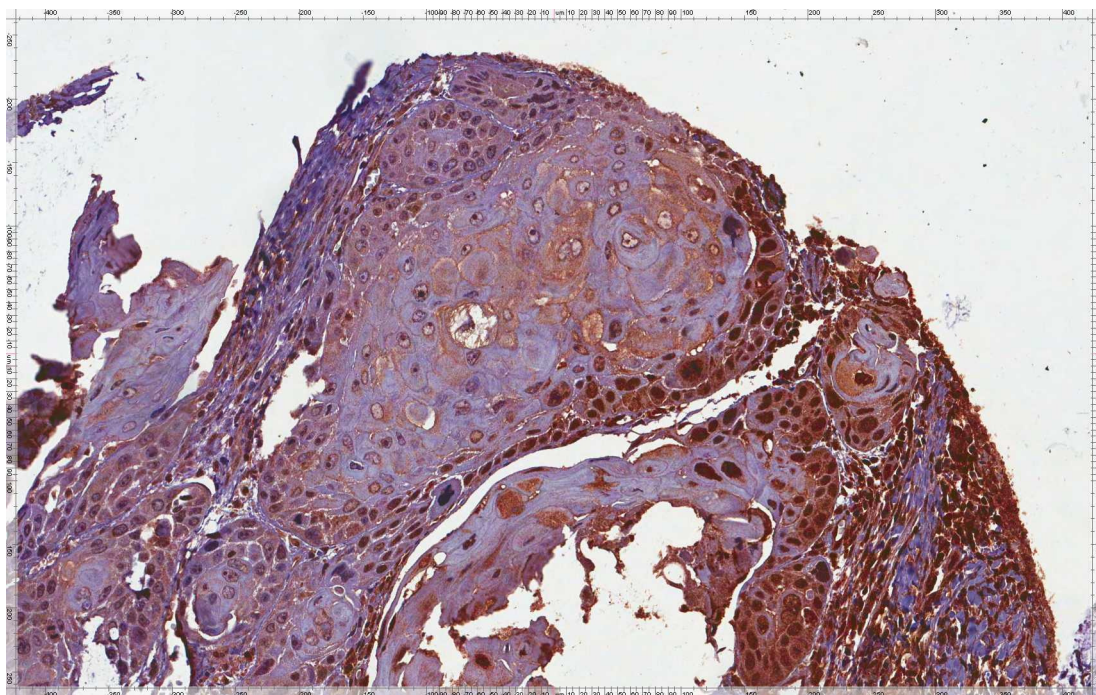


Figura 8 - Carcinoma epidermóide em gengiva inferior com marcação nuclear de p-MAPK (tamanho original 20.0x)

Os tumores não mostraram associações estatisticamente significativas em relação a expressão de PTEN no citoplasma ou nuclear e a localização tumoral (respectivamente $p=0,470$ e $p=0,520$, Figuras 9 e 10). (Tabela 11).

Tabela 11 - Número de porcentagem de pacientes segundo a expressão citoplasmática ou nuclear da proteína PTEN

Categoria		LOCAL DO TUMOR			Total	p*
		Gengiva	Palato duro	Rebordo alveolar		
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)		
Expressão citoplasmática	Negativo	7 (23,3)	10 (33,3)	13 (21,7)	30 (25,0)	0,470
	Positivo	23 (76,7)	20 (66,7)	47 (78,3)	90 (75,0)	
Expressão nuclear	Negativo	9 (28,1)	11 (35,5)	15 (24,2)	35 (28,0)	0,520
	Positivo	23 (71,9)	20 (64,5)	47 (75,8)	90 (72,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

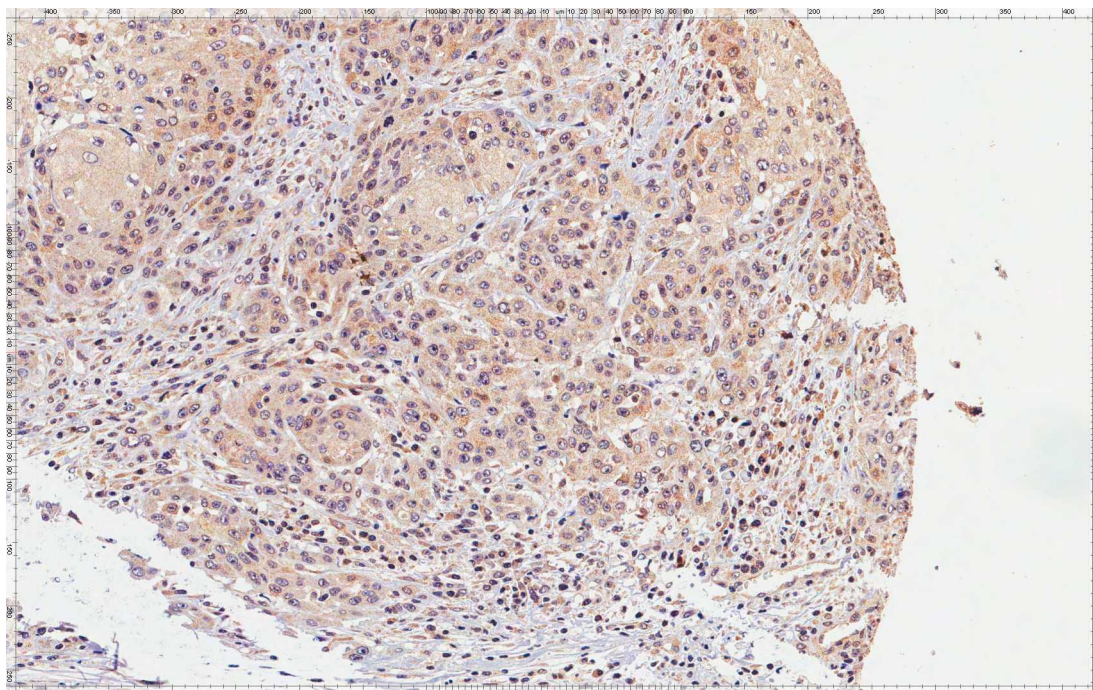


Figura 9 - Carcinoma epidermóide em rebordo alveolar superior com marcação citoplasmática de PTEN (tamanho original 20.0x).

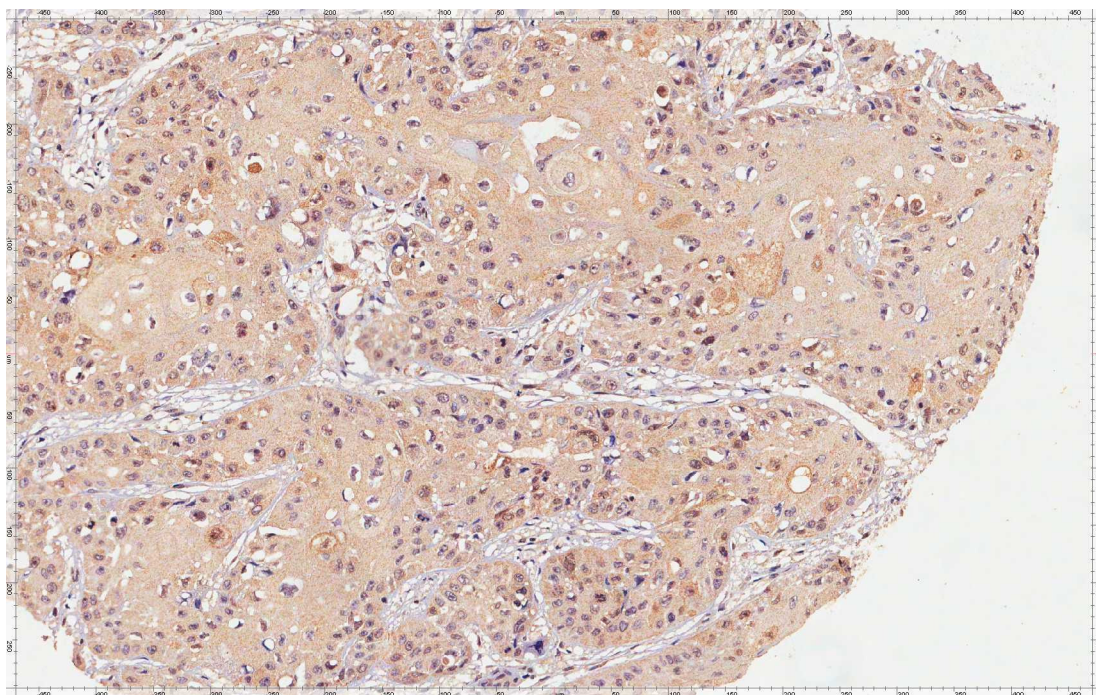


Figura 10 - Carcinoma epidermóide em rebordo alveolar inferior com marcação citoplasmática e nuclear de PTEN (tamanho original 18.0x).

Os valores referentes ao estatus do gene PTEN pelo FISH e o local do tumor são demonstrados na Tabela 12. Observamos que a deleção do PTEN (razão PTEN/Cromos10 < 1) foi encontrada em 33 (39,3%) casos, sendo observada uma frequência discretamente maior nos tumores de palato duro, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0,728$). Observa-se núcleo diplóide (Figura 11) e núcleo com deleção do gene (Figura 12).

Tabela 12 - Número de porcentagem de pacientes de acordo com o estatus do gene PTEN pelo FISH e local do tumor

Estatus do PTEN pelo FISH (razão PTEN/Cromos.10)	LOCAL DO TUMOR			Total	p*
	Gengiva	Palato duro	Rebordo alveolar		
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
<1 (deleção)	6 (31,6)	9 (42,9)	18 (40,9)	33 (39,3)	0,728
≥1 (diploidia)	13 (68,4)	12 (57,1)	26 (59,1)	51 (60,7)	
Total	19 (100,0)	21 (100,0)	44 (100,0)	84 (100,0)	

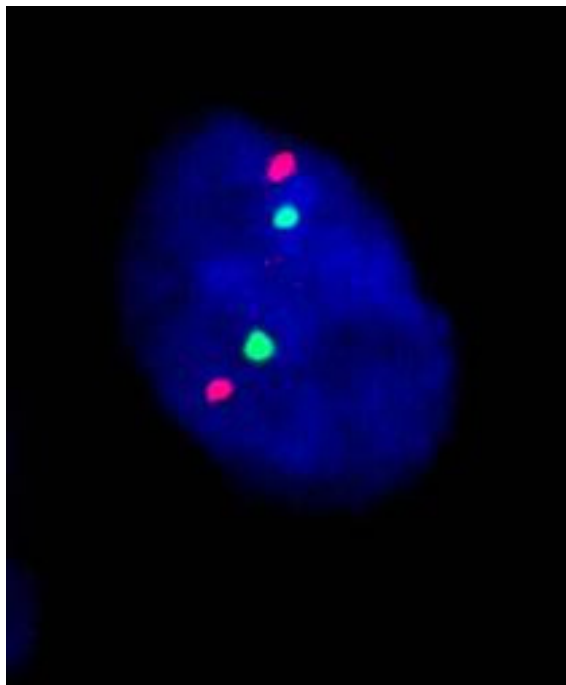


Figura 11 - FISH do PTEN mostrando núcleo diplóide. Os sinais verdes representam a região centromérica do cromossomo 10 e os vermelhos representam o gene PTEN.

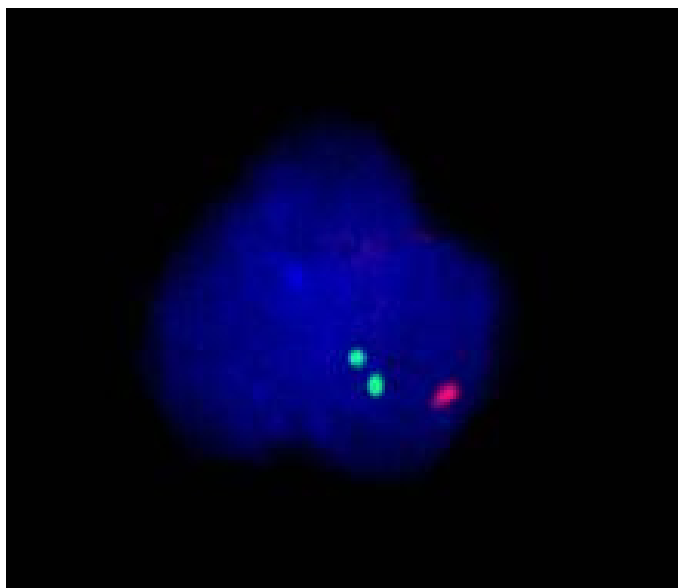


Figura 12 - FISH do PTEN mostrando núcleo com deleção. Os sinais verdes representam a região centromérica do cromossomo 10 e os vermelhos representam o gene PTEN.

5.3 ASSOCIAÇÃO DOS DADOS DA IMUNOISTOQUÍMICA E FISH COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS

Devido ao pequeno número de casos de algumas localizações específicas, decidiu-se, nas análises das correlações dos marcadores imunoistoquímicos e FISH com as características clínicas e histopatológicas, agrupar todos os tumores em um único grupo e nomeá-los de carcinomas da boca. As correlações entre os resultados da expressão imunoistoquímica da proteína PI3K as características clínicas e histopatológicas demonstraram associação estatisticamente significativa apenas com a variável etilismo, sendo a positividade da proteína PI3K mais frequentemente observada nos pacientes não etilistas (97,1% vs 85,7%; $p=0,026$). As demais

variáveis de interesse não apresentaram associações estatisticamente significativas (Tabela 13).

Tabela 13 - Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estágio e a expressão da proteína PI3K

Variável	Categoria	PI3K			p*
		Negativo	Positivo	Total	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Sexo	Masculino	8 (11,1)	64 (88,9)	72 (100,0)	0,070
	Feminino	1 (2,1)	46 (97,9)	47 (100,0)	
Idade	30-59 anos	3 (7,3)	38 (92,7)	41 (100,0)	0,691
	60-69 anos	4 (10,3)	35 (89,7)	39 (100,0)	
	70-91 anos	2 (5,1)	37 (94,9)	39 (100,0)	
Tabagismo	Não	1 (2,8)	35 (97,2)	36 (100,0)	0,205
	Sim	7 (9,5)	67 (90,5)	74 (100,0)	
Etilismo	Não	2 (2,9)	66 (97,1)	68 (100,0)	0,026
	Sim	6 (14,3)	36 (85,7)	42 (100,0)	
Histologia do tumor primário	CEC I	6 (6,3)	90 (93,8)	96 (100,0)	0,633
	CEC II e III	2 (9,1)	20 (90,9)	22 (100,0)	
Estadio	I+II	2 (10,0)	18 (90,0)	20 (100,0)	0,651
	III+IV	7 (7,1)	92 (92,9)	99 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

As análises da associação entre os resultados da expressão imunoistoquímica da proteína p-mTOR no padrão citoplasma, membrana e núcleo não demonstraram associação estatisticamente significativa para todas as variáveis estudadas (Tabelas 14, 15 e 16).

Tabela 14 - Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadió e a proteína p-mTOR no citoplasma

Variável	Categoria	p-mTOR Citoplasma			p*
		Negativo	Positivo	Total	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Sexo	Masculino	9 (12,5)	63 (87,5)	72 (100,0)	0,758
	Feminino	5 (10,6)	42 (89,4)	47 (100,0)	
Idade	30-59 anos	3 (7,3)	38 (92,7)	41 (100,0)	0,518
	60-69 anos	5 (12,8)	34 (87,2)	39 (100,0)	
	70-91 anos	6 (15,4)	33 (84,6)	39 (100,0)	
Tabagismo	Não	3 (8,6)	32 (91,4)	35 (100,0)	0,372
	Sim	11 (14,7)	64 (85,3)	75 (100,0)	
Etilismo	Não	6 (9,0)	61 (91,0)	67 (100,0)	0,138
	Sim	8 (18,6)	35 (81,4)	43 (100,0)	
Histologia do tumor primário	CEC I	8 (8,4)	87 (91,6)	95 (100,0)	0,067
	CEC II e III	5 (21,7)	18 (78,3)	23 (100,0)	
Estadio	I+II	3 (15,0)	17 (85,0)	20 (100,0)	0,622
	III+IV	11 (11,1)	88 (88,9)	99 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

Tabela 15 - Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadió e a proteína p-mTOR na membrana

Variável	Categoria	p-mTOR Membrana			p*
		Negativo	Positivo	Total	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Sexo	Masculino	42 (58,3)	30 (41,7)	72 (100,0)	0,435
	Feminino	24 (51,1)	23 (48,9)	47 (100,0)	
Idade	30-59 anos	25 (61,0)	16 (39,0)	41 (100,0)	0,663
	60-69 anos	20 (51,3)	19 (48,7)	39 (100,0)	
	70-91 anos	21 (53,8)	18 (46,2)	39 (100,0)	
Tabagismo	Não	15 (42,9)	20 (57,1)	35 (100,0)	0,093
	Sim	45 (60,0)	30 (40,0)	75 (100,0)	
Etilismo	Não	33 (49,3)	34 (50,7)	67 (100,0)	0,164
	Sim	27 (62,8)	16 (37,2)	43 (100,0)	
Histologia do tumor primário	CEC I	53 (55,8)	42 (44,2)	95 (100,0)	0,754
	CEC II e III	12 (52,2)	11 (47,8)	23 (100,0)	
Estadio	I+II	10 (50,0)	10 (50,0)	20 (100,0)	0,590
	III+IV	56 (56,6)	43 (43,4)	99 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

Tabela 16 - Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estágio e a proteína p-mTOR no núcleo

Variável	Categoria	p-mTOR Núcleo			p*
		Negativo	Positivo	Total	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Sexo	Masculino	39 (54,2)	33 (45,8)	72 (100,0)	0,417
	Feminino	29 (61,7)	18 (38,3)	47 (100,0)	
Idade	30-59 anos	21 (51,2)	20 (48,8)	41 (100,0)	0,622
	60-69 anos	23 (59,0)	16 (41,0)	39 (100,0)	
	70-91 anos	24 (61,5)	15 (38,5)	39 (100,0)	
Tabagismo	Não	23 (65,7)	12 (34,3)	35 (100,0)	0,403
	Sim	43 (57,3)	32 (42,7)	75 (100,0)	
Etilismo	Não	40 (59,7)	27 (40,3)	67 (100,0)	0,936
	Sim	26 (60,5)	17 (39,5)	43 (100,0)	
Histologia do tumor primário	CEC I	52 (54,7)	43 (45,3)	95 (100,0)	0,363
	CEC II e III	15 (65,2)	8 (34,8)	23 (100,0)	
Estádio	I+II	15 (75,0)	5 (25,0)	20 (100,0)	0,077
	III+IV	53 (53,5)	46 (46,5)	99 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

As análises da associação entre os resultados da expressão imunoistoquímica do p-MAPK no padrão citoplasma não demonstraram associação estatisticamente significativa com a maioria das variáveis estudadas (Tabela 17). Observamos uma maior frequência de expressão deste marcador no grupo de pacientes com estágio clínico III+IV em comparação aos pacientes do grupo de estadiamento I+II (75,0% vs 91,0%; $p=0,042$). Nas análises da expressão de p-MAPK nuclear (Tabela 18) nenhuma variável apresentou associação estatisticamente significativa.

Tabela 17 - Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadio e a proteína p-MAPK no citoplasma

Variável	Categoria	p-MAPK Citoplasma			p*
		Negativo	Positivo	Total	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Sexo	Masculino	11 (15,1)	62 (84,9)	73 (100,0)	0,148
	Feminino	3 (6,4)	44 (93,6)	47 (100,0)	
Idade	30-59 anos	3 (7,3)	38 (92,7)	41 (100,0)	0,132
	60-69 anos	3 (7,7)	36 (92,3)	39 (100,0)	
	70-91 anos	8 (20,0)	32 (80,0)	40 (100,0)	
Tabagismo	Não	3 (8,3)	33 (91,7)	36 (100,0)	0,443
	Sim	10 (13,3)	65 (86,7)	75 (100,0)	
Etilismo	Não	5 (7,4)	63 (92,6)	68 (100,0)	0,073
	Sim	8 (18,6)	35 (81,4)	43 (100,0)	
Histologia do tumor primário	CEC I	10 (10,4)	86 (89,6)	96 (100,0)	0,717
	CEC II e III	3 (13,0)	20 (87,0)	23 (100,0)	
Estadio	I+II	5 (25,0)	15 (75,0)	20 (100,0)	0,042
	III+IV	9 (9,0)	91 (91,0)	100 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

Tabela 18 - Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadio e a proteína p-MAPK no núcleo

Variável	Categoria	p-MAPK Núcleo			p*
		Negativo	Positivo	Total	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Sexo	Masculino	32 (43,8)	41 (56,2)	73 (100,0)	0,548
	Feminino	18 (38,3)	29 (61,7)	47 (100,0)	
Idade	30-59 anos	15 (36,6)	26 (63,4)	41 (100,0)	0,234
	60-69 anos	14 (35,9)	25 (64,1)	39 (100,0)	
	70-91 anos	21 (52,5)	19 (47,5)	40 (100,0)	
Tabagismo	Não	14 (38,9)	22 (61,1)	36 (100,0)	0,705
	Sim	32 (42,7)	43 (57,3)	75 (100,0)	
Etilismo	Não	26 (38,2)	42 (61,8)	68 (100,0)	0,389
	Sim	20 (46,5)	23 (53,5)	43 (100,0)	
Histologia do tumor primário	CEC I	37 (38,5)	59 (61,5)	96 (100,0)	0,233
	CEC II e III	12 (52,2)	11 (47,8)	23 (100,0)	
Estadio	I+II	9 (45,0)	11 (55,0)	20 (100,0)	0,740
	III+IV	41 (41,0)	59 (59,0)	100 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

As análises da associação entre os resultados da expressão imunoistoquímica do p-AKT no padrão citoplasma e nuclear não demonstraram associação estatisticamente significativa com nenhuma variável estudada (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19 - Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadio e a proteína p-Akt no citoplasma

Variável	Categoria	p-Akt Citoplasma			p*
		Negativo	Positivo	Total	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Sexo	Masculino	6 (8,2)	67 (91,8)	73 (100,0)	0,165
	Feminino	1 (2,1)	46 (97,9)	47 (100,0)	
Idade	30-59 anos	2 (4,9)	39 (95,1)	41 (100,0)	0,834
	60-69 anos	3 (7,7)	36 (92,3)	39 (100,0)	
	70-91 anos	2 (5,0)	38 (95,0)	40 (100,0)	
Tabagismo	Não	4 (11,1)	32 (88,9)	36 (100,0)	0,149
	Sim	3 (4,0)	72 (96,0)	75 (100,0)	
Etilismo	Não	3 (4,4)	65 (95,6)	68 (100,0)	0,302
	Sim	4 (9,3)	39 (90,7)	43 (100,0)	
Histologia do tumor primário	CEC I	5 (5,2)	91 (94,8)	96 (100,0)	0,865
	CEC II e III	1 (4,3)	22 (95,7)	23 (100,0)	
Estadio	I+II	2 (10,0)	18 (90,0)	20 (100,0)	0,384
	III+IV	5 (5,0)	95 (95,0)	100 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

Tabela 20 - Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estágio e a proteína p-Akt no núcleo

Variável	Categoria	p-Akt Núcleo			p*
		Negativo	Positivo	Total	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Sexo	Masculino	28 (38,4)	45 (61,6)	73 (100,0)	0,473
	Feminino	15 (31,9)	32 (68,1)	47 (100,0)	
Idade	30-59 anos	12 (29,3)	29 (70,7)	41 (100,0)	0,251
	60-69 anos	18 (46,2)	21 (53,8)	39 (100,0)	
	70-91 anos	13 (32,5)	27 (67,5)	40 (100,0)	
Tabagismo	Não	14 (38,9)	22 (61,1)	36 (100,0)	0,874
	Sim	28 (37,3)	47 (62,7)	75 (100,0)	
Etilismo	Não	23 (33,8)	45 (66,2)	68 (100,0)	0,273
	Sim	19 (44,2)	24 (55,8)	43 (100,0)	
Histologia do tumor primário	CEC I	34 (35,4)	62 (64,6)	96 (100,0)	0,954
	CEC II e III	8 (34,8)	15 (65,2)	23 (100,0)	
Estadio	I+II	9 (45,0)	11 (55,0)	20 (100,0)	0,349
	III+IV	34 (34,0)	66 (66,0)	100 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

As análises da associação do status do gene PTEN no padrão citoplasma e no padrão núcleo também não demonstraram diferença estatisticamente significativa para nenhuma das variáveis analisadas (Tabelas 21 e 22).

Tabela 21 - Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadió e a proteína PTEN no citoplasma

Variável	Categoria	PTEN Citoplasma			p*
		Negativo	Positivo	Total	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Sexo	Masculino	19 (26,0)	54 (74,0)	73 (100,0)	0,746
	Feminino	11 (23,4)	36 (76,6)	47 (100,0)	
Idade	30-59 anos	11 (27,5)	29 (72,5)	40 (100,0)	0,732
	60-69 anos	8 (20,5)	31 (79,5)	39 (100,0)	
	70-91 anos	11 (26,8)	30 (73,2)	41 (100,0)	
Tabagismo	Não	10 (27,8)	26 (72,2)	36 (100,0)	0,583
	Sim	17 (23,0)	57 (77,0)	74 (100,0)	
Etilismo	Não	16 (23,5)	52 (76,5)	68 (100,0)	0,753
	Sim	11 (26,2)	31 (73,8)	42 (100,0)	
Histologia do tumor primário	CEC I	24 (24,7)	73 (75,3)	97 (100,0)	0,805
	CEC II e III	6 (27,3)	16 (72,7)	22 (100,0)	
Estadio	I+II	5 (26,3)	14 (73,7)	19 (100,0)	0,885
	III+IV	25 (24,8)	76 (75,2)	101 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

Tabela 22 - Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadió e a proteína PTEN no núcleo

Variável	Categoria	PTEN Núcleo			p*
		Negativo	Positivo	Total	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Sexo	Masculino	22 (28,9)	54 (71,1)	76 (100,0)	0,769
	Feminino	13 (26,5)	36 (73,5)	49 (100,0)	
Idade	30-59 anos	14 (32,6)	29 (67,4)	43 (100,0)	0,442
	60-69 anos	8 (20,5)	31 (79,5)	39 (100,0)	
	70-91 anos	13 (30,2)	30 (69,8)	43 (100,0)	
Tabagismo	Não	11 (29,7)	26 (70,3)	37 (100,0)	0,754
	Sim	21 (26,9)	57 (73,1)	78 (100,0)	
Etilismo	Não	19 (26,8)	52 (73,2)	71 (100,0)	0,746
	Sim	13 (29,5)	31 (70,5)	44 (100,0)	
Histologia do tumor primário	CEC I	26 (26,3)	73 (73,7)	99 (100,0)	0,334
	CEC II e III	9 (36,0)	16 (64,0)	25 (100,0)	
Estadio	I+II	7 (33,3)	14 (66,7)	21 (100,0)	0,551
	III+IV	28 (26,9)	76 (73,1)	104 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

As análises da associação entre os resultados do FISH do gene PTEN não demonstraram associação estatisticamente significativa com nenhuma variável (Tabela 23).

Tabela 23 - Número de porcentagem de pacientes segundo sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário, estadió e a técnica de FISH do gene PTEN

Variável	Categoria	PTEN razão PTEN/Cromos.10			p*
		<1	≥1	Total	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Sexo	Masculino	21 (43,8)	27 (56,3)	48 (100,0)	0,333
	Feminino	12 (33,3)	24 (66,7)	36 (100,0)	
Idade	30-59 anos	13 (46,4)	15 (53,6)	28 (100,0)	0,626
	60-69 anos	10 (34,5)	19 (65,5)	29 (100,0)	
	70-91 anos	10 (37,0)	17 (63,0)	27 (100,0)	
Tabagismo	Não	9 (31,0)	20 (69,0)	29 (100,0)	0,426
	Sim	20 (40,0)	30 (60,0)	50 (100,0)	
Etilismo	Não	16 (32,0)	34 (68,0)	50 (100,0)	0,254
	Sim	13 (44,8)	16 (55,2)	29 (100,0)	
Histologia do tumor primário	CEC I	27 (42,9)	36 (57,1)	63 (100,0)	0,153
	CEC II e III	5 (25,0)	15 (75,0)	20 (100,0)	
Estadio	I+II	6 (46,2)	7 (53,8)	13 (100,0)	0,581
	III+IV	27 (38,0)	44 (62,0)	71 (100,0)	

p*: teste de associação pelo qui-quadrado

5.4 ANÁLISES UNIVARIADAS DE SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA EM RELAÇÃO AOS DADOS DEMOGRÁFICOS, CLINICOPATOLÓGICOS E BIOMARCADORES APÓS 60 MESES

Na avaliação da sobrevida livre de doença temos variáveis significativamente importantes como grau histológico do tumor (Figura 13), marcação nuclear de mTOR (Figura 14) e estatus do gene PTEN por FISH (Figura 15). As probabilidades

de sobrevida livre de doença acumulada após 1, 3 e 5 anos foram, respectivamente, 72,3%, 57,0% e 54,9% (Tabela 24). Das características demográficas e clínicopatológicas, houve diferença estatisticamente significativa para a variável histologia dos tumores ($p=0,001$), onde os tumores CEC II/III tiveram menores taxas de sobrevida livre de doença em relação aos tumores CEC I. Das demais, apenas a marcação nuclear de p-mTOR e o status do gene PTEN pelo FISH tiveram diferenças estatísticas nas taxas de sobrevida livre de doença (respectivamente, $p=0,037$ e $p=0,011$). Pacientes com marcação nuclear de p-mTOR tiveram taxas de sobrevida livre de doença mais altas quando comparadas às dos pacientes negativos para este padrão neste marcador.

Tabela 24 - Probabilidade de sobrevida livre de doença acumulada após 5 anos

Variável	Categoria	Probabilidade sobrevida livre de doença acumulada			p* (log rank)
		1 ano	3 anos	5 anos	
		(%)	(%)	(%)	
Sexo	Masculino	72,2	54,8	54,8	0,736
	Feminino	72,2	60,8	55,3	
Idade	30-59 anos	71,9	53,4	53,4	0,910
	60-69 anos	76,8	58,5	58,5	
	70-91 anos	67,4	61,7	49,4	
Tabagismo	Não	55,4	48,0	48,0	0,242
	Sim	78,6	60,1	56,3	
Etilismo	Não	59,0	49,5	46,2	0,052
	Sim	88,8	66,4	66,4	
Histologia do tumor primário	CEC I	82,0	63,2	60,6	0,001
	CEC II e III	39,0	34,2	34,2	
Estadio	I+II	70,4	70,4	70,4	0,457
	III+IV	72,5	53,6	51,0	
PI3K	Negativo	83,3	83,3	83,3	0,157
	Positivo	70,1	56,0	53,7	
p-mTOR citoplasma	Negativo	77,4	58,0	58,0	0,893
	Positivo	70,5	57,4	54,9	
p-mTOR membrana	Negativo	75,2	55,5	51,5	0,745
	Positivo	67,3	60,7	60,7	
p-mTOR núcleo	Negativo	68,5	50,1	47,0	0,037
	Positivo	75,0	70,3	70,3	
p-MAPK citoplasma	Negativo	92,9	66,5	66,5	0,360
	Positivo	68,1	56,3	53,9	
p-MAPK núcleo	Negativo	73,6	60,6	53,9	0,837
	Positivo	70,7	55,8	55,8	
p-AKT citoplasma	Negativo	85,7	68,6	68,6	0,568
	Positivo	70,6	56,7	54,5	
p-AKT núcleo	Negativo	67,9	59,9	59,9	0,923
	Positivo	74,4	56,8	53,8	
PTEN citoplasma	Negativo	84,9	74,3	66,0	0,152
	Positivo	66,6	51,0	51,0	
PTEN núcleo	Negativo	84,4	70,3	62,5	0,228
	Positivo	66,6	51,0	51,0	
PTEN (FISH)	Deleção	75,9	70,5	70,5	0,011
	Diploidia	58,0	35,9	35,9	
TOTAL		72,3	57,0	54,9	

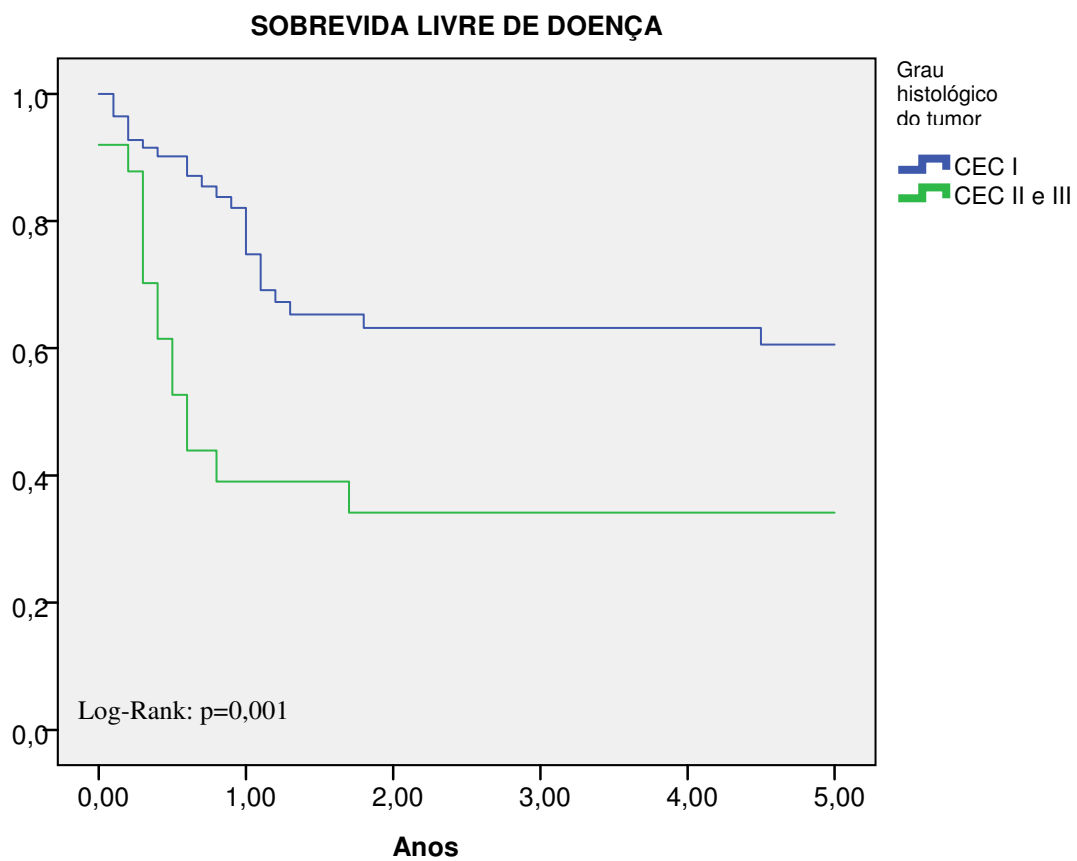


Figura 13 - Curva de Kaplan-Meier para o grau histológico do tumor em relação à sobrevida livre de doença

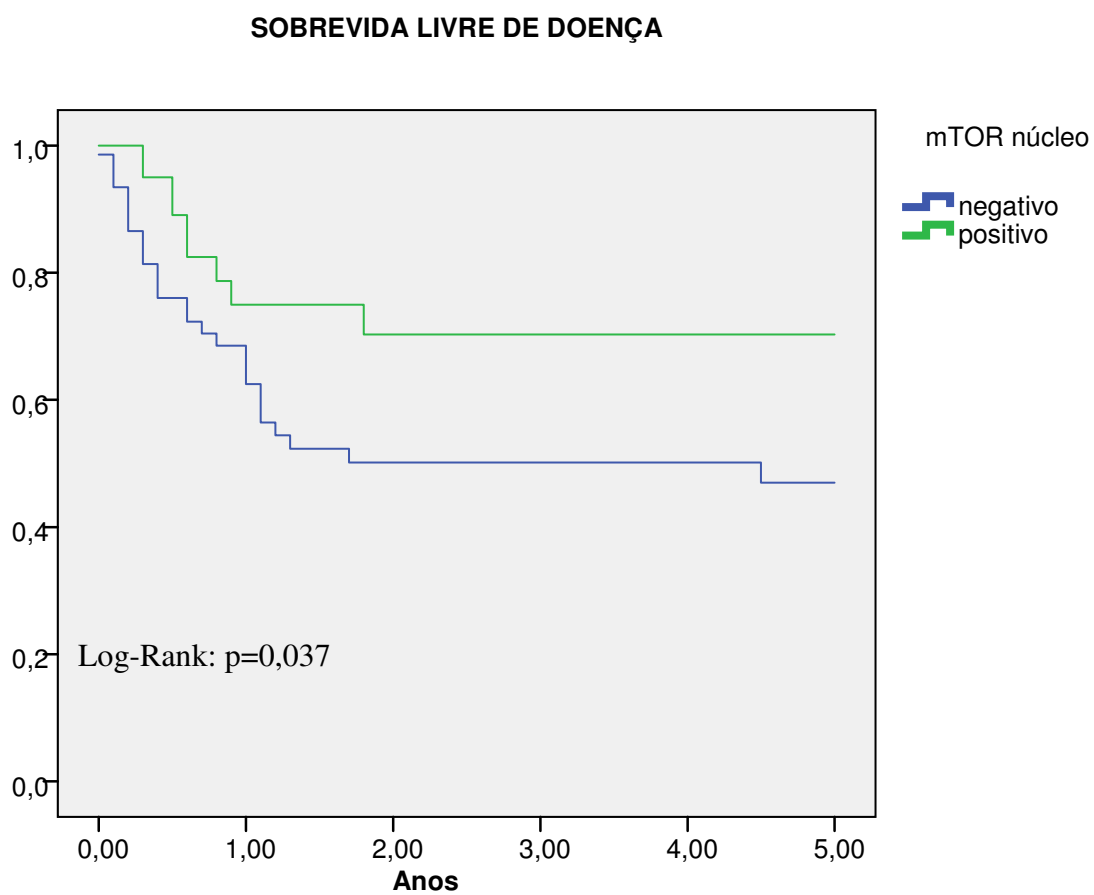


Figura 14 - Curva de Kaplan-Meier para a expressão nuclear de mTOR em relação à sobrevida livre de doença

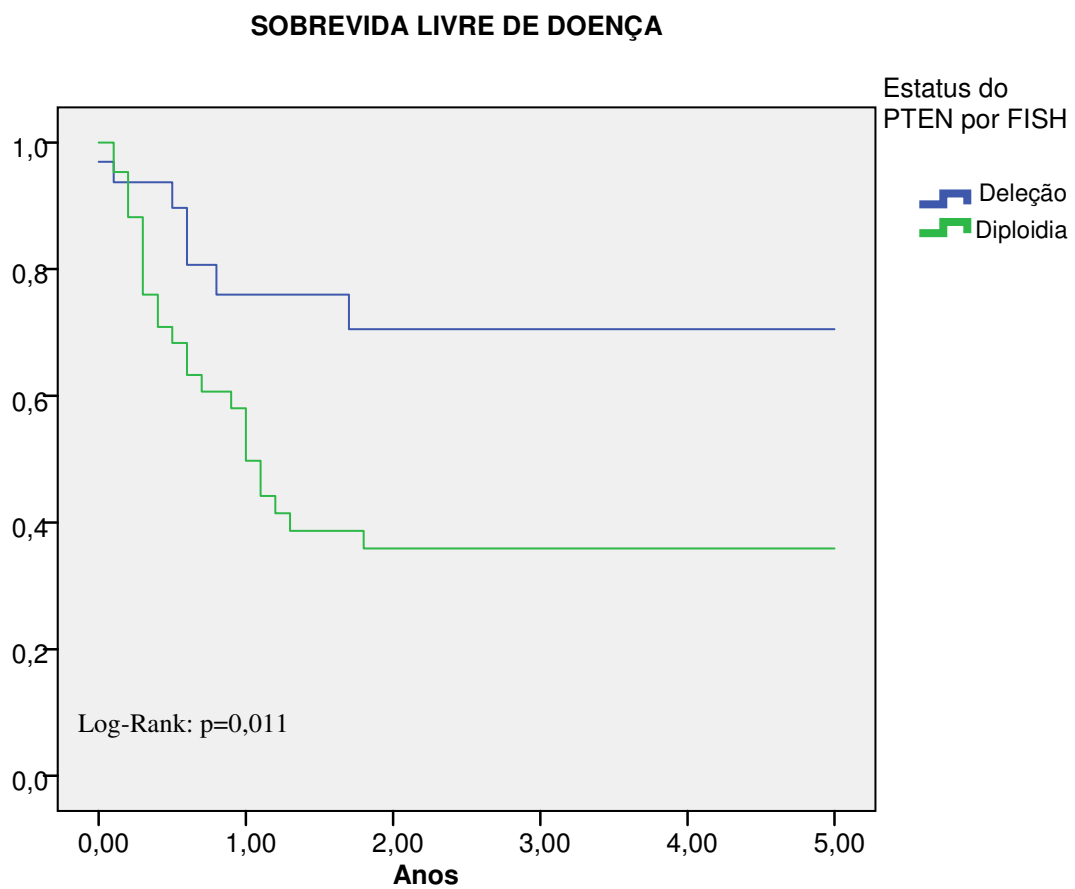


Figura 15 - Curva de Kaplan-Meier do estatus do gene PTEN por FISH em relação à sobrevida livre de doença

5.5 ANÁLISES UNIVARIADAS DE SOBREVIDA GLOBAL EM RELAÇÃO AOS DADOS DEMOGRÁFICOS, CLINICOPATOLÓGICOS E BIOMARCADORES APÓS 5 ANOS

Na avaliação da sobrevida global temos variáveis significativamente importantes como idade (Figura 16) e status do gene PTEN por FISH (Figura 17). As probabilidades de sobrevida global acumulada após 1, 3 e 5 anos foram, respectivamente, 69,8%, 50,0% e 37,5% (Tabela 25). Das características demográficas e clínicopatológicas, houve diferença estatisticamente significativa para a idade ($p=0,037$), onde os pacientes com 70 anos ou mais tiveram menores taxas que os pacientes das demais faixas etárias. Das demais variáveis estudadas, apenas o status do gene PTEN pelo FISH teve diferença estatística nas taxas ($p=0,044$).

Tabela 25 - Probabilidade de sobrevida global após 5 anos

Variável	Categoria	Probabilidade sobrevida livre de doença acumulada			p* (log rank)
		1 ano	3 anos	5 anos	
		(%)	(%)	(%)	
Sexo	Masculino	70,3	46,4	33,4	0,434
	Feminino	68,8	55,4	43,7	
Idade	30-59 anos	72,0	60,7	47,7	0,037
	60-69 anos	79,4	46,3	43,0	
	70-91 anos	58,5	35,9	20,5	
Tabagismo	Não	59,7	46,5	40,5	0,784
	Sim	71,3	49,3	35,1	
Etilismo	Não	66,3	45,5	38,0	0,794
	Sim	74,7	53,1	36,2	
Histologia do tumor primário	CEC I	70,5	53,9	41,6	0,122
	CEC II e III	62,7	27,2	22,7	
Estadio	I+II	75,0	62,5	62,5	0,069
	III+IV	67,5	44,7	32,3	
PI3K	Negativo	100,0	50,0	50,0	0,332
	Positivo	68,7	49,8	39,2	
p-mTOR citoplasma	Negativo	85,1	47,3	37,8	0,728
	Positivo	69,0	50,2	40,5	
p-mTOR membrana	Negativo	73,7	50,1	43,3	0,723
	Positivo	67,1	49,3	36,3	
p-mTOR núcleo	Negativo	68,1	44,0	42,2	0,789
	Positivo	47,8	59,4	36,3	
p-MAPK citoplasma	Negativo	92,9	54,2	32,5	0,542
	Positivo	67,1	48,4	40,3	
p-MAPK núcleo	Negativo	73,2	44,4	34,9	0,860
	Positivo	68,1	51,9	42,2	
p-AKT citoplasma	Negativo	100,0	50,0	33,3	0,704
	Positivo	68,2	49,4	40,2	
p-AKT núcleo	Negativo	79,8	55,5	48,6	0,121
	Positivo	65,5	46,5	35,4	
PTEN citoplasma	Negativo	75,4	58,4	49,4	0,186
	Positivo	67,1	44,8	34,9	
PTEN núcleo	Negativo	72,9	55,3	44,0	0,321
	Positivo	67,1	44,8	34,9	
PTEN (FISH)	Deleção	74,3	61,2	51,7	0,044
	Diploidia	69,3	42,1	29,3	
TOTAL		69,8	50,0	37,5	

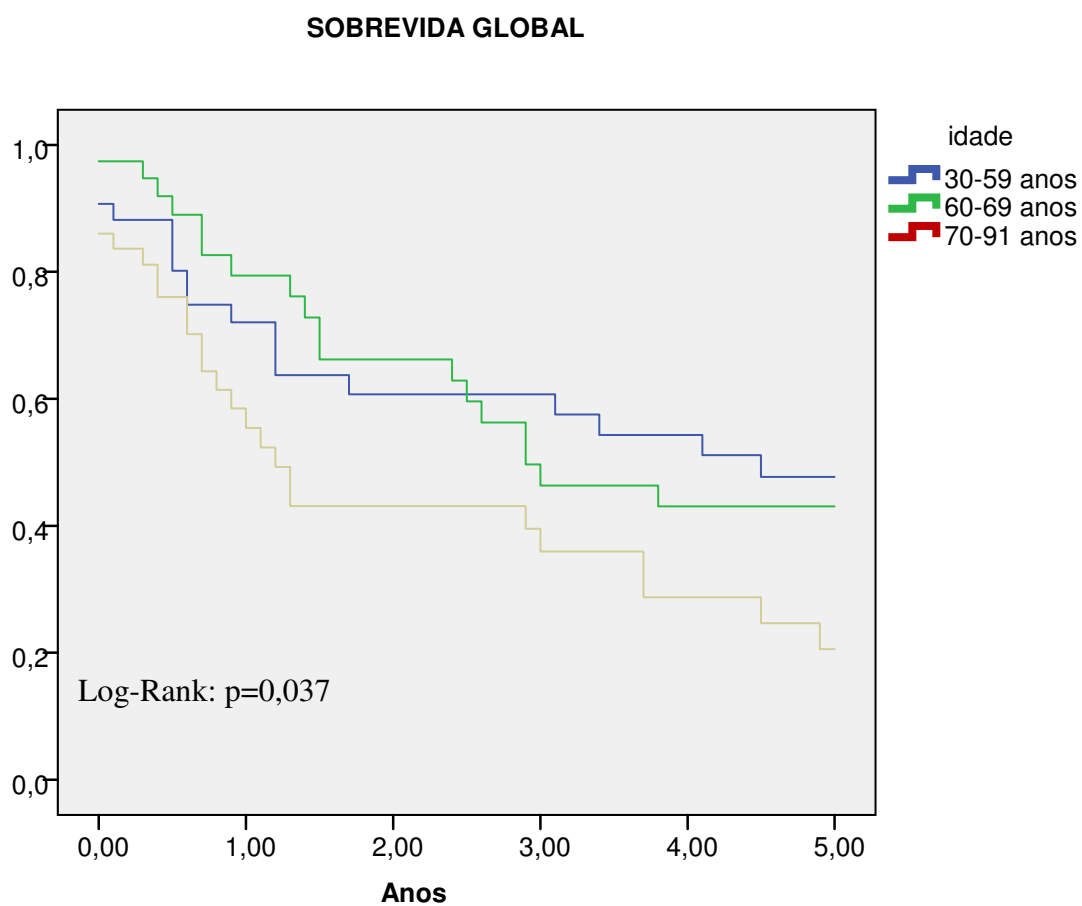


Figura 16 - Curva de Kaplan-Meier para idade em relação à sobrevida global

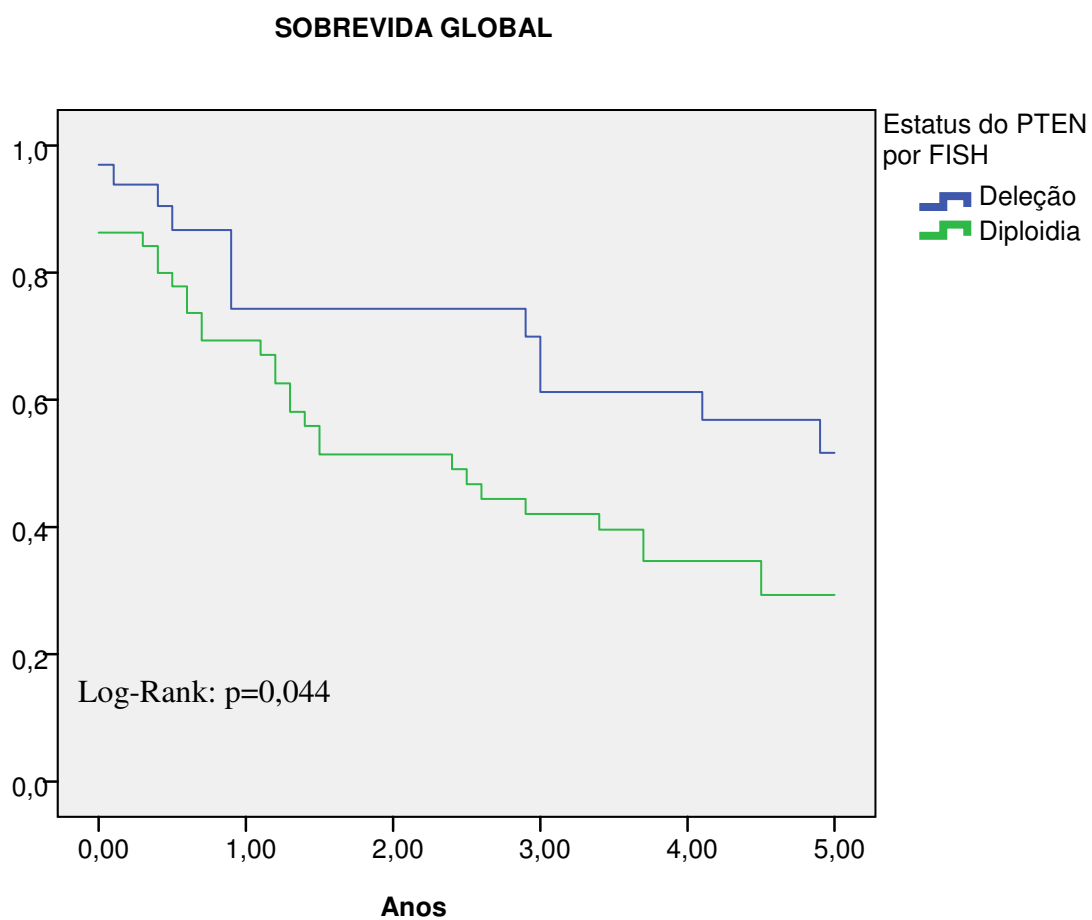


Figura 17 - Curva de Kaplan-Meier do estatus do gene PTEN por FISH em relação à sobrevida global

6 DISCUSSÃO

Conhecer o comportamento clínico das doenças, principalmente a tumorigênese das neoplasias, tornou-se de uns tempos até os dias atuais, um dos objetivos primordiais para os pesquisadores, pois ao esclarecer ou tentar esclarecer a fisiopatologia do câncer, teremos uma seleção de modalidades terapêuticas eficazes e direcionadas aos agentes promotores do desequilíbrio do ciclo celular, e, portanto, melhores condutas terapêuticas e desenvolvimentos de marcadores que possa ser capazes de detectar precocemente lesões que poderiam passar despercebidas e auxiliar no diagnóstico diferencial. Porém, ainda serão necessários anos de intensa investigação e estudos para um entendimento completo da patogênese molecular.

O nosso estudo foi composto predominantemente por tumores localizados no rebordo alveolar inferior (35%) e menos comumente em gengiva superior (8%). Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que a localização mais comum de tumores na boca é lábio e os da cavidade oral (mucosa bucal, gengiva, palato duro, língua parte oral e soalho da boca) (LEE et al. 2007; SUBA 2007; TOLMAN et al. 2007), sendo que o carcinoma epidermóide acomete com maior frequência os tumores em gengiva/rebordo alveolar, seguido pelo carcinoma verrucoso e adenocarcinoma; sendo o tumor nesta localidade muitas vezes confundido com doenças inflamatórias que afetam o periodonto por diversos profissionais (SEOANE et al. 2006; KODUGANTI et al. 2012).

Em relação à idade dos pacientes do nosso estudo, observamos maior frequência dos tumores de gengiva após a 3ª década de vida. Estes resultados são

diferentes daqueles observados na literatura que mostram uma maior frequência de tumores nesta localidade em indivíduos após a 5ª década de vida (LEE et al. 2007; SUBA 2007; TOLMAN et al. 2007). Interessantemente, também observamos que há um predomínio de tumores localizado em gengiva no grupo de pacientes mais jovens, e em pacientes mais idosos a localização predominante foi o palato duro e rebordo alveolar. Estes dados também já foram demonstrados por SUBRAMANIAN et al. (2009) em um estudo longitudinal realizado na Índia, envolvendo quase 200.000 pessoas, onde puderam observar que 95% dos casos de câncer bucal detectados ocorreram em indivíduos que faziam uso de tabaco ou álcool. Os autores concluíram que uma melhor relação custo-benefício dar-se-ia pelo rastreamento em indivíduos de alto risco (que fazem uso de tabaco ou álcool) a partir dos 35 anos. O predomínio de tumores em homens em relação às mulheres é comum em vários tumores da cabeça e pescoço e sistema respiratório devido à associação deste gênero ao hábito de fumar/beber (BARASCH et al. 1995). O nosso estudo encontrou um total de 60,8% dos tumores analisados em homens, e 67,8% dos pacientes eram fumantes, mas a maioria eram não etilistas (61,7%).

Carcinoma epidermóide de gengiva tem prognóstico relativamente pobre por apresentarem como diagnósticos diferenciais, periodontite e osteomielite fazendo com que muitas vezes o diagnóstico chegue tarde demais. Em relação ao estadiamento clínico observamos que a maioria dos nossos casos eram em estágio avançado (agrupados em estágio III e IV), dado este concordante com a maioria das publicações como SEOANE et al. (2006) que afirmam que os tumores de gengiva se apresentam em estágio clínico avançado principalmente relacionados à rápida infiltração óssea. Este dado deve estar relacionado principalmente ao diagnóstico

tardio destas neoplasias devido ao seu crescimento lento e assintomático (CHOI et al. 2011).

Estudos anteriores mostram alguns resultados sugerindo que a gradação histológica (CEC I, II e III) é um fator preditivo significativo e independente para linfonodos cervicais (KURITA et al. 2004; GONZÁLEZ-GARCÍA et al. 2007). Em nosso estudo a maioria dos pacientes apresentou tumores bem diferenciados (CEC I – 79,8%) e associação estatisticamente significativa para esvaziamento cervical nos tumores localizados em gengiva e rebordo alveolar ($p < 0,001$). O tratamento consiste na cirurgia e radioterapia, todavia o controle local deve ser feito periodicamente (YOROZU et al. 2001), devido à capacidade de infiltração. Os nossos resultados estão de acordo com o autor citado anteriormente apresentando uma porcentagem de 39,2 para a associação do tratamento cirúrgico e radioterápico.

O desenvolvimento do câncer está relacionado com o acúmulo de alterações genéticas, particularmente nos genes que regulam crescimento, diferenciação e morte celular, em genes que promovem estabilidade, reparo do DNA e a imunidade celular e humoral (SCHOELCH et al. 1999; COLETTA et al. 2002).

Diversos autores têm mostrado a participação da via do PI3K/Akt/mTOR em conjunto com a via das MAP cinases no controle da proliferação de diversos tipos celulares (MIRZA et al. 2004; CHAMBARD et al. 2007; CUI e ALMAZAN 2007). A interação desta via com a da PI3K/Akt/mTOR para alguns autores parece ser um fator determinante para a permissão da progressão do ciclo celular (MIRZA et al. 2004; CHAMBARD et al. 2007).

O gene PTEN é silenciado em neoplasias malignas devido a mutações ou deleções, os quais levam à ativação constitutiva do Akt e à regulação positiva do mTOR (CANTLEY e NEEL 1999).

A via PI3K/Akt/mTOR está super-ativada nos cânceres tornando-a um bom alvo terapêutico, ao contrário da via do p53 que se encontra desativada; por isso é mais fácil inibir uma ativação do que recuperar uma função perdida (HENNESSY et al. 2005). Segundo CULLY et al. (2006), o câncer de mama demonstrou que a redução da expressão da proteína PTEN ou a ativação da proteína Akt, promovem susceptibilidade à inibição da via PI3K/Akt por inibidores do mTOR. Alteração funcional na via PI3K/Akt/mTOR e PTEN é frequente em carcinoma de cavidade oral, sendo que as terapias que objetivem como alvo a inibição destas vias podem ser promissoras no tratamento desse tipo de câncer; por esse e outros estudos a respeito, recentemente o mTOR passou a ser considerado como alvo molecular para tratamento de diversos tipos de carcinoma, incluindo o câncer de cavidade oral.

Utilizamos neste estudo a imunoistoquímica para pesquisa de proteínas e o FISH para a pesquisa do DNA.

De maneira geral observamos no nosso estudo que a expressão de todas as proteínas da via PI3K/mTOR/PTEN estão frequentemente expressas nos CEC da cavidade oral. Em relação a localização celular das proteínas estudadas, observamos que a marcação da proteína PI3K foi observada somente no citoplasma na maioria das células neoplásicas, sendo este padrão observado homogeneamente nos tumores das diversas localizações. A expressão da proteína p-mTOR foi observada no citoplasma, membrana e núcleo das células sendo observado o padrão de marcação predominante a positividade no citoplasma. Para este marcador, observamos que a

marcação na membrana celular foi mais frequente nos tumores localizados na gengiva e rebordo alveolar, enquanto que a marcação nuclear foi predominante encontrada nos tumores localizados no palato duro. Embora estes achados não tenham mostrado associações estatisticamente significativas (respectivamente $p=0,949$, $0,485$, $0,075$ e $0,164$). Estes dados já foram descritos por LOPICCOLO et al. (2008), MURAYAMA et al. (2009) e YU et al. (2009) em tumores gástricos.

A expressão da proteína p-MAPK foi observada no citoplasma e núcleo das células tumorais e não mostraram associações estatisticamente significativas em relação a expressão deste marcador e a localização tumoral.

Os tumores estudados também foram frequentemente positivos para PTEN tanto no núcleo quanto no citoplasma, mas também não mostraram associações estatisticamente significativas em relação a localização tumoral. Segundo SQUARIZE et al. (2002), a expressão imunoistoquímica do PTEN está relacionada a tumores de baixo grau de malignidade em carcinomas de cavidade oral, enquanto sua ausência relacionada com tumores de cavidade oral de alto grau de malignidade. Durante muito tempo o PTEN era considerado uma proteína exclusiva da região citoplasmática; todavia, alguns estudos dizem que o PTEN pode se localizar tanto em citoplasma quanto núcleo, sendo principal localização em células normais na região nuclear (GERICKE et al. 2006; LI et al. 2006).

Os ensaios de imunofluorescência têm como objetivo identificar ganhos ou deleções da proteína PTEN. A proteína PTEN como supressor tumoral se encontra frequentemente alterado em diversos tumores, além de estar subregulado em carcinomas da cavidade oral. Observamos deleção do PTEN (razão PTEN/Cromos10 < 1) em 33 (39,3%) casos, sendo observada uma frequência discretamente maior nos

tumores de palato duro, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0,728$). Alguns autores relatam que a perda da expressão do PTEN não é incomum, podendo ser um bom marcador de prognóstico (LEE et al. 2001; SQUARIZE et al. 2002), assim como na pesquisa de PEDRERO et al. (2005) que observaram que a ativação do oncogene Akt foi uma consequência da perda da expressão do PTEN.

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre a expressão de todas as proteínas estudadas da via PI3K/mTOR/PTEN e variáveis clínicas e histopatológicas como sexo, idade, tabagismo, etilismo, histologia do tumor primário e estágio, talvez devido ao fato da casuística ser antiga e/ou pequena e faltar dados nos prontuários; todavia, esperava-se encontrar diferença em relação a variável tabagismo pelo fato de fumar estar associado a alterações celulares.

Em relação as taxas de sobrevida livre de doença, encontramos associações significativas na expressão imunoistoquímica de mTOR nuclear e a deleção do gene PTEN pelo FISH (respectivamente, $p=0,037$ e $p=0,011$). Pacientes com marcação nuclear de p-mTOR núcleo tiveram taxas de sobrevida livre de doença mais altas quando comparadas às dos pacientes negativos para este padrão neste marcador. Pacientes com deleção de PTEN tiveram probabilidades de sobrevida livre de doenças maiores do que as dos pacientes diploides para PTEN. Estes dados são inéditos na literatura e acreditamos que novos estudos com uma maior casuística serão necessários para a validação destes achados.

Pacientes com idade igual ou superior a 70 anos apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto à sobrevida global corroborando com diversos autores (SEOANE et al. 2006; LEE et al. 2007; BINAHMED et al. 2008).

Nosso estudo demonstrou que as proteínas PI3K/AKT/mTOR, MAPK e PTEN apresentaram-se freqüentemente expressas nos CEC da cavidade oral. Contudo, novos estudos devem ser realizados para confirmação e estabelecimento destes potenciais marcadores.

7 CONCLUSÕES

- 1 Os carcinomas epidermóides avaliados localizam-se predominantemente no rebordo alveolar inferior, seguidos do palato duro, gengiva inferior, rebordo alveolar superior e gengiva superior. Ocorrem predominantemente em homens, sendo as localizações mais frequentes neste gênero a gengiva e palato duro. A localização mais comum nos pacientes de faixa etária mais jovem é a gengiva e nos pacientes idosos o palato duro e rebordo alveolar. O grau histológico mais frequente é o bem diferenciado (Grau I). Os tumores de palato duro estão associados ao tabagismo;
- 2 Por imunoistoquímica observamos positividade das proteínas PI3K, p-mTOR, p-MAPK, p-Akt e PTEN no citoplasma na maioria dos casos (92,4%, 88,2%, 88,3%, 94,2% e 75% respectivamente). Positividade nuclear foi observada para as proteínas p-mTOR, PTEN, p-Akt e p-MAPK (42,9%, 72%, 64,2 % e 58,2% respectivamente). A expressão na membrana celular foi encontrada somente para a proteína p-mTOR em 44,5% dos casos;
- 3 A deleção de PTEN por FISH é frequente nos CEC da boca (39%) sendo os tumores de palato duro mais frequentemente deletados. A probabilidade de sobrevida livre de doença é aparentemente maior nos pacientes com deleção de PTEN em relação aos pacientes diplóides para esse gene;

- 4 Não há diferenças estatisticamente significativas entre os dados obtidos por imunoistoquímica e FISH com a maioria das características clínicas e histopatológicas dos carcinomas epidermóides de boca (gengiva, rebordo alveolar e palato duro). Correlação estatisticamente significativa foi encontrada somente entre a expressão citoplasmática da proteína PI3K e etilismo e a expressão de p-MAPK e CEC estádios III e IV;
- 5 A marcação nuclear do p-mTOR correlacionou-se aumento na sobrevida livre de doença, podendo ser considerado um possível fator molecular preditivo;
- 6 A idade dos pacientes é um fator importante para a sobrevida global, pois quanto maior idade menor é a sobrevida global acumulada.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ainamo J, Löe H. Anatomical characteristics of gingiva: a clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. **J Periodontol** 1966; 37:5-13.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of literature and recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand J Dent Res** 1987; 95:229-49.

Avery JK. **Oral development and histology**. 2nd ed. New York: Thieme Medical; 1994. Histology of the periodontium: alveolar bone, cementum and periodontal ligament; p.144-63.

Barasch A, Gofa A, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Squamous cell carcinoma of the gingiva. A case series analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1995; 80:183-7.

Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene Akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. **Science** 1991; 254:274-7.

Bill TJ, Reddy VR, Ries KL, Gampper TJ, Hoard MA. Adolescent gingival squamous cell carcinoma: report of a case and review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2001; 91:682-5.

Binahmed A, Charles M, Campisi P, Forte V, Carmichael RP, Sándor GK. Primary squamous cell carcinoma of the maxillary alveolus in a 10-year-old girl. **J Can Dent Assoc** 2007; 73:715-8.

Binahmed A, Nason RW, Hussain A, Abdoh AA, Sándor GK. Treatment outcomes in squamous cell carcinoma of the maxillary alveolus and palate: a population-based study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2008; 105:750-4.

Brown J. Mechanisms of cancer invasion of the mandible. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg** 2003; 11:96-102.

Cady B, Catlin D. Epidermoid carcinoma of the gum: a 20-year survey. **CA Cancer J Clin** 1970; 20:44-7.

Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression:PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 6:4240-5.

Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. **Biochem Biophys Acta** 2007; 1773:1299-310.

Choi EJ, Zhang X, Kim HJ, Nam W, Cha IH. Prognosis of gingival squamous cell carcinoma diagnosed after invasive procedures. **Asian Pacific J Cancer Prevention** 2011; 12:2649-52.

Clark C, Shah S, Herman-Ferdinandez L, et al. Teasing out the best molecular marker in the Akt/mTOR pathway in head and neck squamous cell cancer patients. **Laryngoscope** 2010; 120:1159-65.

Coletta RD, Cotrim P, Almeida OP, Alves VA, Wakamatsu A, Vargas PA. Basaloid squamous carcinoma of oral cavity: a histologic and immunohistochemical study. **Oral Oncol** 2002; 38:723-9.

Cui QL, Almazan G. IGF-I-induced oligodendrocyte progenitor proliferation requires PI3K/Akt, MEK/ERK, and Src-like tyrosine kinases. **J Neurochem** 2007; 100:1480-93.

Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. **Nature** 2006; 6:184-92.

Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. **Cell** 2000; 100:387-90.

Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD. Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:718-27.

Enslin H, Davis RJ. Regulation of MAP kinases by docking domains. **Bio Cell** 2001; 93:5-14.

Evans JF, Shah JP. Epidermoid carcinoma of the palate. **Am J Surg** 1981; 142:451-5.

Gericke A, Munson M, Ross AH. Regulation of PTEN phosphatase. **Gene** 2006; 374:1-9.

González-García R, Naval-Gías L, Sastre-Pérez J, et al. Contralateral lymph neck node metastasis of primary squamous cell carcinoma of the tongue: a retrospective analytic study of 203 patients. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2007; 36:507-13.

Gu J, Tamura M, Pankov R, et al. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. **J Cell Biol** 1999; 146:389-403.

Harding MW. Immunophilins, mTOR, and pharmacodynamic strategies for a targeted cancer therapy. **Clin Cancer Res** 2003; 9:2882-6.

Hassell TM. Tissues and cells of the periodontium. **Periodontol 2000** 1993; 3:9-38.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev** 2004; 18:1926-45.

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

Hong SX, Cha IH, Lee EW, Kim J. Mandibular invasion of lower gingival carcinoma in the molar region: its clinical implications on the surgical management. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2001; 30:130-8.

Huang S, Houghton PJ. Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic. **Curr Opin Investig Drugs** 2002; 3:295-304.

Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. **Curr Opin Pharmacol** 2003; 3:371-77.

Irié T, Aida T, Tachikawa T. Gene expression profiling of oral squamous cell carcinoma using laser microdissection and cDNA microarray. **Med Electron Microsc** 2004; 37:89-96.

Khan SM, Gossweiler MK, Zunt SL, Edwards MD, Blanchard SB. Papillary squamous cell carcinoma presenting on the gingiva. **J Periodontol** 2005; 76:2316-21.

Kirsch C. Oral cavity cancer. **Top Magn Reson Imaging** 2007; 18:269-80.

Koduganti RR, Sehrawat S, Reddy PV. Gingival squamous cell carcinoma: a diagnostic impediment. **J Indian Soc Periodontol** 2012; 16:104-7.

Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem J** 2000; 351:289-305.

Kuratomi K, Yano H, Tsuneoka M, Sakamoto K, Kusukawa J, Kojiro M. Immunohistochemical expression of Mina53 and Ki67 proteins in human primary gingival squamous cell carcinoma. **Kurume Med J** 2006; 53:71-8.

Kurita H, Koike T, Narikawa JN, et al. Clinical predictors for contralateral neck lymph node metastasis from unilateral squamous cell carcinoma in the oral cavity. **Oral Oncol** 2004; 40:898-903.

Lee JO, Yang H, Georgescu MM, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. **Cell** 1999; 99:323-34.

Lee JJ, Soria JC, Hassan KA, et al. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2001; 127:1441-5.

Lee JJ, Cheng SJ, Lin SK, Chiang CP, Yu CH, Kok SH. Gingival squamous cell carcinoma: mimicking a dentoalveolar abscess: report of a case. **J Endod** 2007; 33:177-80.

Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. **Science** 1997; 275:1943-7.

Li PY, Auyeung L, Huang SC. Squamous cell carcinoma of the mandibular gingiva. **Chang Gung Med J** 2004; 27:777-80.

Li AG, Piluso LG, Cai X, Wei G, Sellers WR, Liu X. Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN. **Mol Cell** 2006; 23:575-87.

LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. **Drug Resist Updat** 2008; 11:32-50.

Mavros A, Hahn M, Wieland I, et al. Infrequent genetic alterations of the tumor suppressorgene PTEN/MMAC1 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **J Oral Pathol Med** 2002; 31:270-6.

Mirza AM, Gysin S, Malek N, Nakayama K, Roberts JM, McMahon M. Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT. **Mol Cell Biol** 2004; 24:10868-81.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Murayama T, Inokuchi M, Takagi Y, et al. Relation between outcomes and localization of p-mTOR expression in gastric cancer. **Br J Cancer** 2009; 100:782-8.

Myers MP, Tonks NK. PTEN: sometimes taking it off can be better than putting it on. **Am J Hum Genet** 1997; 61:1234-8.

Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, et al. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. **J Biol Chem** 1999; 274:21528-32.

Nathan CO, Amirghahri N, Rice C, Abreo FW, Shi R, Stucker FJ. Molecular analysis of surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Laryngoscope** 2002; 112:2129-40.

Nathan CO, Amirghahari N, Abreo F, et al. Overexpressed eIF4E is functionally active in surgical margins of head and neck cancer patients via activation of the Akt/mammalian target of rapamycin pathway. **Clin Can Res** 2004; 10:5820-27.

Nathanson A, Jakobsson PA, Wersäll J. Prognosis of squamous-cell carcinoma of the gums. **Acta Otolaryngol** 1973; 75:301-3.

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

Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, et al. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI3K/Akt/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2005; 114:242-8.

Potter GD. The hard palate. **Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med** 1973; 118:415-9.

Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S, Hall A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. **Science** 2004; 303:1179-81.

Razis E, Briasoulis E, Vrettou E, et al. Potential value of PTEN in predicting cetuximab response in colorectal cancer: an exploratory study. **BMC Cancer** 2008; 8:234.

Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. **Microbiol Mol Biol** 2004; 68:320-44.

Sacks DB. The role of scaffold proteins in MEK/ERK signalling. **Biochem Soc Trans** 2006; 34:833-6.

Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, et al. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 1999; 35:333-42.

Seoane J, Varela-Centelles PI, Walsh TF, Lopez-Cedrun JL, Vazquez I. Gingival squamous cell carcinoma: diagnostic delay or rapid invasion? **J Periodontol** 2006; 77:1229-33.

Silva SD, Perez DE, Nishimoto IN, et al. Fatty acid synthase expression in squamous cell carcinoma of the tongue: clinicopathological findings. **Oral Dis** 2008; 14:376-82.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. **TNM Classification of malignant tumours**. 7th ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2011. Lip and oral cavity; p.25-9.

Soo KC, Spiro RH, King W, Harvey W, Strong EW. Squamous carcinoma of the gums. **Am J Surg** 1988; 156:281-5.

Squarize CH, Castilho RM, 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** 2002; 31:379-84.

Staal SP. Molecular cloning of the Akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. **Proc Natl Acad Sci** 1987; 84:5034-7.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nat Genet** 1997; 15:356-62.

Stolk-Liefferink SA, Dumans AG, van der Meij EH, Knecht PP, van der Wal KG. Oral squamous cell carcinoma in children; review of an unusual entity. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol** 2008; 72:127-31.

Stugis EM. A review of social and behavioral efforts at oral cancer preventions in India. **Head Neck**. 2004; 26:937-44.

Suba Z. Gender-related hormonal risk factors for oral cancer. **Pathol Oncol Res** 2007; 13:195-202.

Subramanian S, Sankaranarayanan R, Bapat B, et al. Cost-effectiveness of oral cancer screening: results from a cluster randomized controlled trial in India. **Bull World Health Organ** 2009; 87:200-6.

Sunnybrook Research Institute. **Human tumour tissue microarrays**. Available from: <URL:http://sunnybrook.ca/research/content/?page=sri_core_genom equip_8_8> [2012 jun 13].

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. **Science** 1998; 280:1614-7.

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

Thompson FH, Nelson MA, Trent JM, et al. Amplification of 19q13.1-q13.2 sequences in ovarian cancer. G-band, FISH, and molecular studies. **Cancer Genet Cytogenet** 1996; 87:55-62.

Tiwari R. Squamous cell carcinoma of the superior gingivolabial sulcus. **Oral Oncol** 2000; 36:461-5.

Tolman A, Jerrold L, Alarbi M. Squamous cell carcinoma of attached gingival. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 2007; 132:378-81.

Vazquez F, Sellers WR. The PTEN tumor suppressor protein:an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. **Biochim Biophys Acta** 2000; 1470:M21-35.

Williams HK Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. **Mol Pathol** 2000; 53:165-72.

Wilson TG Jr. Compliance and its role in periodontal therapy. **Periodontology** 2000 1996, 12:16-23.

Yorozu A, Sykes AJ, Slevin NJ. Carcinoma of the hard palate treated with radiotherapy: a retrospective review of 31 cases. **Oral Oncol** 2001; 37:493-7.

Yu G, Wang J, Chen Y, et al. Overexpression of phosphorylated mammalian target of rapamycin predicts lymph node metastases and prognosis of chinese patients with gastric cancer. **Clin Cancer Res** 2009; 15:1821-9.

Anexo 1 - Ficha utilizada para a coleta de dados clínicos e microscópicos relativos ao pacientes com carcinoma epidermóide de gengiva, rebordo alveolar e palato duro

I- Identificação e dados demográficos

1. Número no estudo..... | | | | |
2. Registro Hospitalar..... | | | | | | | | | | |
3. Idade (anos)..... | | | | |
4. Sexo 1- masculino 2-feminino..... | |

II- História Clínica

5. Tempo de história: _____ meses (999 se desconhecido)
6. Tabagismo: 0-não 1-sim 9-não há informação..... | |
7. Etilismo: 0-não 1-sim 9-não há informação..... | |

III- Loco-regional

8. Local do tumor: 1-gengiva superior 2-gengiva inferior 3-palato duro 4-rebordo alveolar inferior
5-rebordo alveolar superior..... | |
9. Estádio T: 1-T1 2-T2 3-T3 4-T4 9-Tx..... | |
10. Estádio N: 0-N0 1-N1 2-N2a 3-N2b 4-N2c 5-N3 9-Nx | |
11. Estádio M: 0-M0 1-M1..... | |
12. Data do início do tratamento..... | | / | | / | |
13. Sequência de tratamento 0-não 1-cirurgia 2-RXT 3-QT..... | |
14. Data da cirurgia: 999-não realizado..... | | / | | / | |
15. Mandibulectomia: | |
0-não 1-marginal 2-sagital 3-seccional 4-hemimandibulectomia
5-mandibulectomia subtotal/total
16. Palatectomia: 0-não 1-palatectomia 2- maxilectomia maior..... | |
17. Esvaziamento cervical: | |
0-não 1-SOH 2-radical/radical modificado 3-Radical/Radical modificado+SOH contralateral
4-SOH bilateral 5-Radical bilateral 6-Outro unilateral 7-Outro bilateral
18. Reconstrução: | |
0-não 1-placa 2-placa+miocutânea 3- peitoral maior
4-crista ilíaca micro 5-fíbula micro 6-outro
19. Margens ósseas: 0-não 1-Livres 2-Exíguas 3-Comprometidas..... | |
20. Partes moles: 0-não 1-Livres 2-Exíguas 3-Comprometidas..... | |

IV- Anatomopatológico da peça da cirurgia inicial

21. Número do AP.....|_|_|_|
22. Histologia do tumor primário: 1-CEC I 2-CEC II 3-CEC III|_|
23. Embolização ou invasão vascular sanguínea 0-não observado 1-sim.....|_|
24. Embolização ou invasão vascular linfática 0-não observado 1-sim.....|_|
25. Invasão perineural 0-não observado 1-sim.....|_|
26. Espessura da lesão (mm) (999) ignorado.....|_|_|_|
27. Data do início da RXT:|_| / |_| / |_|
28. Dose radioterapia.....
29. Comprometimento linfonodal:
- a) Total dissecado.....|_|_|_|
- b) Número comprometido.....|_|_|_|
- c) Ruptura capsular 0-N- 1-N+ RC- 2-N+ RC+.....|_|
- d) Níveis afetados 0-nã 1-ipsilateral 2-I 3-II 4-III 5-IV 6-V.....|_|
30. Ca Espinocelular – Pérolas Córneas: 0-Ausente 1-Presente.....|_|
31. Ca Espinocelular – Disqueratose: 0-Ausente 1-Presente.....|_|
32. Ca Espinocelular – Pontes intercelulares: 0-Ausente 1-Presente.....|_|
33. Ca Espinocelular – Figuras de Mitoses: 0-Ausente 1-Presente.....|_|
34. Ca Espinocelular – Hiperchromatismo: 0-Ausente 1-Presente.....|_|
35. Ca Espinocelular – Pleomorfismo: 0-Ausente 1-Presente.....|_|
36. Padrão Erosivo 0-Ausente 1-Presente.....|_|
37. Padrão Invasivo 0-Ausente 1-Presente.....|_|
38. Atividade Osteoclástica 0 1 2 3.....|_|
39. Formação Óssea Subperiosteal 0 1 2 3.....|_|
40. IM ao anticorpo :...../mm²
41. IM ao anticorpo :...../mm²

V- Evolução

42. Recidiva/Metástase 0-não 1-local 2-linfonodo 3-distância.....|_|
43. Data da primeira metástase ou recidiva:|_| / |_| / |_|
44. Data da última informação:|_| / |_| / |_|
45. Situação da última informação:|_|
- 1-Vivo sem doença 2-Vivo com doença 3-Morto pela doença
- 4-Morto durante o tratamento 5-Morto por outra causa 6-Perdido de vista

Anexo 2 - Protocolo da técnica de Imunoistoquímica

- 1- Desparafinização e hidratação dos cortes histológicos: 3 banhos em Xilol (5 minutos cada), 4 banhos de álcool, lavagem por 5 minutos em água corrente;
- 2- Recuperação antigênica na Pascal (Câmara de Pressão) em solução Citrato pH 6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi). Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 3- Bloqueio da peroxidase endógena: 3 banhos de 5 minutos cada com Peróxido de Hidrogênio 10 volumes;
- 4- Lavagem em PBS;
- 5- Bloqueio de proteínas: 20 minutos com Bloqueador de Proteínas (DAKO);
- 6- Incubação dos anticorpos primários, anti- pmTOR (Cell Signaling - clone 49F9), anti- PTEN (DAKO, clone 6H2.1), anti- pAKt (Cell Signaling - clone 587F11), anti- PI3K (Abcam, policlonal), anti- MAPK (Cell Signaling – clone D13.14.45) por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida;
- 7- Lavagem em PBS;
- 8- Incubação com anticorpo secundário (Advance HRP Link - DAKO) por 30 minutos (Ta);
- 9- Lavagem em PBS;
- 10- Incubação com Polímero (Advance HRP enzyme - DAKO) por 30 minutos (Ta);
- 11- Lavagem em PBS;
- 12- Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidine (DAB) 5 minutos (Kit Liquid DAB+ Substrate Chromogen System; DakoCytomation, Carpinteria, California);
- 13- Lavagem em água corrente;
- 14- Contra coloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;
- 15- Lavagem em água corrente por 5 minutos;
- 16- Desidratação em álcool, Xilol, montagem em meio permanente.

Anexo 3 - Protocolo da técnica de FISH

- 1- Desparafinização em Xilol -3 banhos de 10 minutos cada;
- 2- Passagens em álcool – 3 banhos de 5 minutos cada;
- 3- Passagem em água destilada - 3 banhos de 2 minutos cada;
- 4- Banho em solução 0.2N HCl – por 20 minutos à temperatura ambiente;
- 5- Pré-tratamento em Citrato pH 6,0 - 80° C em Banho-maria por 1 hora;
- 6- Digestão enzimática com pepsina (pronta pra uso) por 8 minutos à temperatura ambiente;
- 7- Lavagem em solução de 2 X SSC por 2 minutos à temperatura ambiente;
- 8- Desidratação em álcool, 75%, 80%, 100% por 2 minutos cada;
- 9- Secagem das lâminas ao ar;
- 10- Aplicação da sonda LSI PTEN SpectrumOrange/ CEP10 SpectrumGreen (LSI[®] PTEN/CEP 10 Dual Color Probe, Vysis) 10µl e incubação no Hibridizador para Denaturação e Hibridização por 10 horas;
- 11- Pré-aquecer solução de UREA/0,1 x SSC em banho-maria à 45°C ;
- 12- Mergulhar as lâminas em solução de UREA/ 0,1 x SSC – 45°C por 30 minutos;
- 13- Lavar em solução 2xSSC por 2 minutos à temperatura ambiente;
- 14- Desidratação em álcool 75%, 80% e 100% por 2 minutos cada;
- 15- Secagem das lâminas ao ar;
- 16- Aplicar 15µl DAPI, montar com lamínula.