



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**FILIPE NOBRE CHAVES**

**ESTUDO DA VIA PI3K/AKT E DA PERDA DE  
HETEROZIGOSIDADE DO GENE SUPRESSOR TUMORAL  
PTEN EM LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

**FORTALEZA  
2017**

FILIPPE NOBRE CHAVES

**ESTUDO DA VIA PI3K/AKT E DA PERDA DE  
HETEROZIGOSIDADE DO GENE SUPRESSOR TUMORAL  
PTEN EM LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karuza Maria Alves Pereira

**FORTALEZA  
2017**

**FILIPPE NOBRE CHAVES**

**ESTUDO DA VIA PI3K/AKT E DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DO GENE SUPRESSOR TUMORAL PTEN EM LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

Tese de doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia; Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Fábio Wildson Gurgel Costa  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Roberta Barroso Cavalcante  
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

---

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy  
Universidade Federal do Pernambuco – UFPE

*A Deus, Minha Mãe, Vilminha, Minha  
família e meus amigos, por me fazerem sorrir  
todos os dias.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Rosângela e Helder**, ao meu irmão **Samir**, pela dedicação à nossa família e por ensinarem e demonstrarem, a cada dia, os verdadeiros valores da vida que me tornaram o ser humano que sou hoje.

À minha esposa, **Vilminha**, pela compreensão da ausência durante esses muitos meses e pelo amor incondicional durante todos os momentos, sempre estando comigo em todos os desafios, fortalecendo-me e ajudando a vencê-los.

Aos meus **familiares**, por sempre e de forma incondicional, incentivarem-me nos momentos de incerteza. Coloco em especial também meus sogros, **João Alberto e Imaculada**.

À minha orientadora, **Professora Karuza Maria Pereira Alves**, pelos grandes ensinamentos científicos, éticos, pessoais e morais transmitidos, fazendo-me ter profunda admiração profissional e pessoal. Sou grato pela sua disponibilidade, palavras de incentivo, conhecimento transmitido e ajuda no meu processo de formação profissional, vivenciando momentos empolgantes para um tipo 6.

À **amiga Thâmara**, pela oportunidade de conviver ao lado de um ser humano impecavelmente inteligente, simples e acessível, não medindo esforços para transmitir toda a sua sabedoria. Ao meu amigo **Samuel**, pela sinceridade, companheirismo, amizade e momentos de incentivo para superarmos juntos os obstáculos de nossa jornada. Enfim, “Irmãos” que Deus possibilitou estar ao meu lado.

Ao meu amigo **Paulo Goberlânio**, pela ajuda intelectual, estatística e pessoal durante o desenrolar do estudo.

Ao **Professor Fábio Wildson**, ao qual devo grande parte da minha formação profissional, pela antiga parceria científica. Obrigado pela confiança, oportunidades, carinho e momentos de alegria e por sua amizade.

Aos professores **Ana Paula Negreiros Nunes Alves, Fabrício Bitu Sousa** e ao professor

**Mário Rogério Lima Mota**, por investir e confiar neste projeto, pela antiga parceria científica, bem como pelo nosso trabalho diário, formando um forte vínculo entre Laboratório de Patologia Bucodental e Universidade Federal do Ceará campus Sobral.

Aos meus “irmãos patológicos” **Eálber, Stefane, Mariana e Thaís**, por serem sempre a fonte de meu apoio e de sorrisos durante os experimentos.

Ao meu grande amigo e técnico em anatomia patológica **Alceu Machado** não apenas pelos impecáveis cortes histológicos, mas especialmente pela amizade e a todos os **colegas e amigos** do Laboratório de Patologia Bucodental.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFC, Ambulatório de Estomatologia da UFC – Sobral e Laboratório de Patologia Bucodental** pela **HONRA** de eu ter feito parte e lutado pelo seu crescimento e reconhecimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e por acreditar em nossa pesquisa.

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o  
que é possível, e de repente você estará fazendo o  
impossível”*

(São Francisco de Assis)

## RESUMO

**Introdução:** As desordens potencialmente malignas (DPM) orais, constituem um grupo de lesões que apresentam risco para o desenvolvimento de carcinomas epidemóides orais (CEO), destacando entre estas a Displasia Epitelial Oral (DEO). Tem sido descrito que a via PI3K / AKT é uma das vias que está desregulada nos cânceres, apresentando o *PTEN* como um gene supressor para essa via. Entretanto ainda pouco se conhece como essa via está envolvida no processo de transformação maligna nas DPM. Perda de heterozigosidade (LOH) tem sido evidenciado como um preditor de transformação maligna em DEO e em carcinomas de diversas localizações. Além disso, sugere-se que a perda alélica do *PTEN* também ocorra em estágios iniciais de lesões malignas e esteja envolvida nos mecanismos da carcinogênese oral. Assim, compreender melhor o papel dessa via no processo de carcinogênese oral é de suma importância, buscando identificar possíveis marcadores moleculares para o câncer oral.

**Objetivo:** Avaliar a via PI3K/AKT no processo de malignização em DPM de diferentes estágios e em CEOs, através da imunexpressão de pAKT, pJNK, FoxO3a e Ki-67, além de realizar avaliação imunomolecular do gene supressor tumoral *PTEN* em amostras de DEO e CEO, com diferentes tipos histológicos de malignidade, por meio da análise de LOH em duas regiões cromossômicas e avaliação imunoistoquímica da proteína PTEN. **Materiais e**

**Métodos:** Para a análise imunoistoquímica da via PI3K/AKT, foi realizado um estudo qualitativo e quantitativo, em diferentes localizações celulares, de 20 casos de DEO, 20 casos de CEO e 5 casos de mucosa oral normal, submetidos a reação imunoistoquímica para os anticorpos anti-pAKT, anti-pJNK, anti-FoxO3a e anti-Ki-67. Para a análise molecular, na amostra constituída de 19 DEO e 16 CEO foi realizada a análise de LOH por meio de marcadores de região microssatélites do *PTEN*, D10S1765 e AFMA086WG9, localizados nas regiões cromossômicas 10q23.3 e 10q23.31 respectivamente. Também foi realizada a avaliação imunoistoquímica da proteína PTEN para avaliar se a LOH deste gene está envolvida na expressão proteica em DEO e em diferentes estágios histológicos de CEO. **Resultados:** Na análise imunoistoquímica da via PI3K/AKT, foi observado uma maior imunomarcção de p-AKT nuclear em pacientes com CEO ( $21,2 \pm 19,0$ ) quando comparado a DEO ( $7,9 \pm 8,1$ ) e controle ( $1,8 \pm 4,7$ ) ( $p = 0,002$ ). Uma maior imunomarcção forte nuclear de p-JNK foi encontrada nos controles ( $48,3 \pm 13,7$ ) quando comparada a DEOs ( $11,0 \pm 10,3$ ) e CEOs ( $1,1 \pm 1,3$ ) ( $p < 0,001$ ). Imunomarcção nuclear forte de FoxO3a estava ausente nos CEOs estudados ( $0,0 \pm 0,1$ ) com pouca marcação em DEOs ( $3,2 \pm 5,4$ ) e expressão aumentada em controles



(13,5 ± 4,8) (p <0,001). A média das células positivas para Ki-67 foi diretamente associada ao grau de diferenciação celular (p <0,001). Na análise molecular de LOH, foi demonstrado que para o marcador AFMA086WG9 foi evidenciada retenção alélica em 89,5% dos casos de DEOs e em 100% de CEOs, na análise do marcador D10S1765 foi demonstrada LOH em 57,2% de DEOs e 50% de CEOs. Na avaliação imunoistoquímica de PTEN, foi detectada imunomarcção nuclear e citoplasmática, com maior imunomarcção nuclear em células de CEOs, em comparação com DEOs e grupo controle (p <0,001), além de um forte imunomarcção citoplasmática nos casos de CEOs do que em DEOs (p <0,045). **Conclusões:** A via PI3K / AKT parece estar envolvida no processo de malignidade de DEOs, especialmente p-JNK e FoxO3a com atividade antitumoral em OED e OSCCs analisados. Nós fornecemos provas de que a perda alélica de PTEN está presente em lesões orais pré-malignas e OSCCs, no entanto, a LOH neste gene não influenciou a sua expressão protéica nos casos avaliados. Além disso, a imunoexpressão PTEN em DEO e CEO também foi evidenciada, sendo independente de seu estadiamento histopatológico, provando que a PTEN não parece influenciar a tumorigênese dos CEOs.

**Palavras-chave:** Carcinoma de Células Escamosas; Lesão Pré-Cancerosa; Perda de Heterozigidade; Imuno-Histoquímica; PTEN; Fosfatidilinositol 3-Quinase.

## ABSTRACT

**Introduction:** Oral Potentially Malignant Lesions (PML) is a group of lesions that present a risk for the development of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSSC), including Oral Epithelial Dysplasia (OED). PTEN is a tumor suppressor gene of the PI3K / AKT pathway, which is one of the more deregulated pathways of cancer. However, it is still unknown how this pathway is involved in the malignant transformation process of PML. The heterozygosity loss (LOH) profiles were validated as predictors of malignant transformation of OED and in carcinomas from several locations. In addition, it is not known whether the allelic loss of PTEN also occurs in malignant lesions in the early stage and, as well, is involved as one of the mechanisms of oral carcinogenesis. In addition, it is suggested that allelic loss of PTEN also occurs in the early stages of malignant lesions and is involved in the mechanisms of oral carcinogenesis. Thus, a better understanding of the role of pathway in the process of oral carcinogenesis is necessary, searching for possible molecular markers for oral cancer. **Objective:** To evaluate the PI3K/AKT pathway in the malignant transformation process of PML and CEOs, through the immunoexpression of pAKT, pJNK, FoxO3a and Ki-67, besides performing immunomolecular evaluation of the PTEN tumor suppressor gene in DEO and CEO samples, with different histological types of malignancy, through the analysis of LOH in two chromosomal regions and immunohistochemical evaluation of the PTEN protein. **Materials and methods:** Tissue samples of 20 cases of OSCCs, 20 OEDs and 5 cases of normal oral mucosa were subjected to immunohistochemistry reactions for anti-p-AKT, anti-p-JNK, anti-FoxO3a and anti-Ki-67 antibodies. It was analyzed quantitative (number of immunostained cells) and qualitative (immunostaining intensity) parameters in different cell immunostaining sublocations. For molecular analysis, formalin-fixed paraffin-embedded samples of 19 OED and 16 OSCC were included to immunohistochemistry and LOH analysis. For the immunohistochemical study, 5 random fields with greater immunoreactivity were photomicrographed and it was done the count of keratinocytes which showed cytoplasmic and nuclear staining. For LOH analysis, 2 polymorphic microsatellite markers (AFMA086WG9 and D10S1765) localizing to chromosomes 10 were used to detect LOH. **Results:** Nuclear p-AKT was observed significantly greater immunostaining in CEOs ( $21.2 \pm 19.0$ ) than in dysplasias ( $7.9 \pm 8.1$ ) and control ( $1.8 \pm 4.7$ ) ( $p = 0.002$ ). Immunostaining of strong nuclear p-JNK was greater in controls ( $48.3 \pm 13.7$ ) than in OEDs ( $11.0 \pm 10.3$ ) and OSCCs ( $1.1 \pm 1.3$ ) ( $p < 0.001$ ). Strong nuclear

immunostaining of FoxO3a proved to be absent in OSCCs ( $0.0 \pm 0.1$ ) with little staining on dysplasia ( $3.2 \pm 5.4$ ) and increased expression in controls ( $13.5 \pm 4.8$ ) ( $p < 0.001$ ). The mean Ki-67 positive cells were directly associated with the degree of cell differentiation ( $p < 0.001$ ). Molecular analysis of LOH, it was demonstrated that for marker AFMA086WG9 allelic retention in 89.5% of OEDs cells and in 100% of OSCC cells, in the analysis of marker D10S1765 LOH was demonstrated in 57.2% of OEDs and 50 % of OSCCs. Higher nuclear immunostaining was detected in cases of OSCCs when compared to OEDs and control group ( $p < 0.001$ ) and strong cytoplasmic immunostaining was more present in OSCCs ( $p < 0.045$ ).

**Conclusion:** The PI3K / AKT pathway appears to be involved in the process of malignancy of DEOs in this research, especially p-JNK and FoxO3a with antitumor activity in both OED and OSCCs analyzed. We provide evidence that the allelic loss of PTEN is present in premalignant oral lesions e OSCCs, however the LOH in this gene did not influence its protein expression in the evaluated cases. In addition, the PTEN immunoexpression in DEO and CEO was also evidenced, being independent of its histopathological staging, proving that PTEN does not seem to influence the tumorigenesis of CEOs.

**Key-words:** Carcinoma, Squamous Cell; Precancerous Conditions; Loss of Heterozigosity; Immunohistochemistry; PTEN Phosphohydrolase; Phosphatidylinositol 3-Kinase.

## LISTAS DE FIGURAS

- Figura 2.1** Estrutura molecular e mecanismos de ativação da Classe IA e Classe IB de PI3K. 27
- Figura 2.2** Esquema simplificado mostrando a ativação dos subprodutos da Classe IA e as múltiplas ações celulares da via PI3K. 28
- Figura 2.3** Esquema simplificado mostrando a ativação de FoxO e as múltiplas ações celulares da via PI3K. 30
- Figura 2.4** Representação esquemática do papel de PTEN como regulador da via PI3K. PTEN desfosforila a posição D3 de PtdIns-3,4,5-P3 (PIP3,4,5), reduzindo seus níveis na célula. Esta ação afeta muitos processos celulares diferentes. Akt, uma serina/treonina quinase, está envolvida na regulação da transcrição, tradução e apoptose. 32
- Figura 3.1.1** Imunomarcção de P-Akt foi observada em membrana, citoplasma, núcleo e perinúcleo de células malignas. Em NOE (B1), foi observada uma fraca imunomarcção citoplasmática (seta) e ausência de imunorreatividade em membrana de p-AKT (maior aumento). Nas OED, foi observado uma maior imunomarcção citoplasmática forte no grupo das OED de alto risco (maior aumento), e uma prevalência de imunocoloração citoplasmática moderada em B2 (seta) e maior prevalência de forte imunocoloração citoplasmática em B3 (seta). Em OSCC, a imunomarcção de p-AKT foi observada em membrana, no citoplasma, no núcleo e na região perinuclear (maior aumento em B4 e B5). Em B4 é evidenciada uma maior imunomarcção perinuclear (seta) e em B5 uma maior imunomarcção nuclear (seta). Imunomarcção de p-JNK foi encontrada em núcleo e citoplasma de OSCC, OED e NOE. Observou uma maior imunomarcção nuclear forte diretamente associada a gradação do controle (C1) para a OED (C2 e C3) e OSCC (C4 e C5), em C1 observamos uma predominância de marcação nuclear forte (maior aumento e seta), enquanto em C4 uma imunomarcção nuclear fraca é mais evidente (maior aumento e seta). A expressão nuclear de p-JNK em OSCC parece ser perdida de acordo com o grau de transformação maligna. Imunomarcção de FoxO3a foi observada em núcleo e citoplasma de OSCC, OED e NOE. A perda de expressão nuclear em FoxO3a se assemelha aos padrões observados em p-JNK, mostrando predominância de imunomarcção nuclear forte em D1 (seta), imunomarcção nuclear moderada e fraca em D2 e D3 (maior

aumento e seta). Ausência de marcação nuclear de p-JNK foi mais observada no grupo OSCC (maior aumento; D4 e D5) e uma maior imunomarcacão citoplasmática de p-JNK foi observada em OSCC, com a marcação citoplasmática fraca em D4 e moderado em D5 (seta e ampliacão maior). A intensidade e o número de células imunossinistadas com Ki-67 aumentam com a progressão das células da doença maligna. A imunomarcacão de Ki-67 foi observada no nucleoplasma e no núcleo de células malignas (maior aumento e seta; E4 e E5), e na imunocoloração de NOE foi restrita a camadas basais e parabasais camadas epiteliais (E1).

**Figura 3.1.2** Diagrama de caminho descrevendo a análise de covariância do perfil de imunomarcacão dos Carcinomas Epidermóides Orais. Os retângulos representam as variáveis avaliadas. As setas representam as correlações entre os padrões de imunomarcacão. Os números adjacentes às setas são coeficientes de covariância. As variáveis à esquerda são assumidas como causalmente antes daqueles à direita. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . **61**

**Figura 3.1.3** Diagrama de caminho descrevendo a análise de covariância do perfil de imunomarcacão das Displasias Epitéliais Orais. Os retângulos representam as variáveis avaliadas. As setas representam as correlações entre os padrões de imunomarcacão. Os números adjacentes às setas são coeficientes de covariância. As variáveis à esquerda são assumidas como causalmente antes daqueles à direita. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . **62**

**Figura 3.2.1** Imunoexpressão de PTEN em DEO, CEO e mucosa normal. Imunomarcacão homogênea observada na amostra de mucosa normal e uma imunomarcacão heterogênea em CEO e DEO. (A) Mucosa normal onde observa-se muitas células com forte imunomarcacão citoplasmática. (B) Controle positivo com imunomarcacão moderada. (C) CEO mostrando imunomarcacão nuclear extensa associada a forte imunomarcacão citoplasmática na periferia da ilha tumoral. (D) DEO com imunomarcacão nuclear ausente e imunomarcacão citoplasmática fraca. (E) CEO exibindo imunomarcacão nuclear ausente associada a forte imunomarcacão citoplasmática. (F) DEO apresentando imunomarcacão nuclear localizada e imunomarcacão citoplasmática forte e ausente. (Anti-PTEN, 400x LSAB) **92**

**Figura 3.2.2** Áreas de imunocoloração heterogênea de PTEN em CEO (A / 400x LSAB) e DEO (B / 400x LSAB). **93**

**Figura 4.1** Análise de covariância entre a imunomarcacão de pAKT, pJNK, FoxO3a, **97**

Ki-67 e PTEN no controle.

**Figura 4.2** Análise de covariância entre a imunomarcação de pAKT, pJNK, FoxO3a, Ki-67 e PTEN em displasias epiteliais orais (DEO). **97**

**Figura 4.3** Análise de covariância entre a imunomarcação de pAKT, pJNK, FoxO3a, Ki-67 e PTEN em carcinomas epidermóides orais (CEO). **98**

## LISTAS DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.1</b>	Especificações dos anticorpos	<b>63</b>
<b>Tabela 3.1.2</b>	Média e intensidade de células imunomarcadas em membrana, citoplasma e núcleo em displasia epitelial oral e carcinoma de células escamosas orais.	<b>64</b>
<b>Tabela 3.1.3</b>	Média e intensidade de células imunomarcadas em membrana, citoplasma e núcleo de displasia epitelial oral de baixo e alto risco.	<b>65</b>
<b>Tabela 3.1.4</b>	Média e intensidade de células imunomarcadas em membrana, citoplasma e núcleo de displasia epitelial oral de baixo e alto risco e carcinoma de células escamosas orais.	<b>66</b>
<b>Tabela 3.2.1</b>	Média do número de células quanto a intensidade de imunomarcação citoplasmática e nuclear em displasia epitelial oral e carcinoma epidermóides orais.	<b>87</b>
<b>Tabela 3.2.2</b>	Dados de LOH e FAL sobre CEO e DEO para os marcadores de microssatélites AFMa086wg9 e D10S1765	<b>88</b>
<b>Tabela 3.2.3</b>	Padrão de perda de heterozigosidade e retenção alélica para cada marcador microssatélite em relação a diagnóstico histopatológico.	<b>89</b>
<b>Tabela 3.2.4</b>	Padrão de perda de heterozigosidade em OED, de alto e baixo risco, e OSCC, de alto e baixo grau em relação aos marcadores microssatélites Afma086wg9 e D10S1795.	<b>90</b>
<b>Tabela 3.2.5</b>	Padrão de perda de heterozigosidade em DEO e CEO para o marcador D10S1765 em relação a imunoexpressão nuclear e citoplasmática de PTEN.	<b>91</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AKT</b>	Do inglês <i>Protein Kinase B</i>
<b>APC</b>	Do inglês <i>Adematous Polyposis Coli</i>
<b>APPL1</b>	Do inglês <i>Adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1</i>
<b>ANOVA</b>	Do inglês <i>Analysis of Variance</i>
<b>CDKN2A</b>	Do inglês <i>Ciclin Dependent Kinase Inhibitor 2a</i>
<b>CEO</b>	Carcinoma Epidermoide Oral
<b>CNS</b>	Conselho Nacional de Saúde
<b>DAB</b>	3-3'-diaminobenzidina
<b>DEO</b>	Displasia Epitelial Oral
<b>DCC</b>	Do inglês <i>Deleted in Colon Câncer</i>
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EGFR</b>	Do inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<b>FGFR</b>	Do inglês <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
<b>FoxO3a</b>	Do inglês <i>Forkhead box O3</i>
<b>FAL</b>	Do inglês <i>Fraction of Allelic Loss</i>
<b>GEF</b>	Do inglês <i>Guanosine nucleotide exchange factors</i>
<b>GAP</b>	Do inglês <i>GTPases-Activating Proteins</i>
<b>H&amp;E</b>	Do inglês Hematoxylin & Eosin
<b>HIF</b>	Fator Indutor de Hipóxia
<b>Hsp90</b>	Do inglês <i>Heat shock protein 90</i>
<b>HPV</b>	Papiloma Vírus Humano
<b>IGF-IR</b>	Do inglês <i>Insulin-like growth factor 1</i>
<b>JNK</b>	Do inglês <i>Jun N-terminal kinases</i>
<b>LPM</b>	Lesão Potencialmente Maligna
<b>LO</b>	Leucoplasia Oral
<b>LOH</b>	Do inglês <i>Loss of Heterozygosity</i>



<b>MMAC1</b>	Do inglês <i>Mutated in Multiple Advanced Cancer 1</i>
<b>MMP-9</b>	Do inglês <i>Matrix Metalloproteinase 9</i>
<b>mTOR</b>	Do inglês <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
<b>mTORC1</b>	Do inglês <i>mTORC complex 1</i>
<b>mTORC2</b>	Do inglês <i>mTORC complex 2</i>
<b>pAKT</b>	Akt fosforilado
<b>PCR</b>	Do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>
<b>PDK-1</b>	Do inglês <i>Kinase-3'-phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
<b>PI3K</b>	Do inglês <i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
<b>PIK3CA</b>	Do inglês <i>Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate3-kinase catalytic subunit</i>
<b>PIN 1</b>	Do inglês <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1</i>
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Do inglês <i>Phosphatidylinositol-4,4-bisphosphate</i>
<b>PIP<sub>3</sub></b>	Do inglês <i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>
<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PTEN</b>	Do inglês <i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
<b>P-REX2</b>	Do inglês “ <i>phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 2</i> ”
<b>RHEB 1</b>	Do inglês <i>Ras homolog enriched in brain</i>
<b>RTK</b>	Do inglês <i>Receptor tyrosine kinase</i>
<b>siRNA</b>	Do inglês <i>Small Interfering RNA</i>
<b>SNP</b>	Do inglês <i>Single-nucleotide Polymorphism</i>
<b>TEP1</b>	Do inglês <i>Telomerase Protein Component 1</i>
<b>TCL 1</b>	Do inglês <i>Leukemia/lymphoma protein 1A</i>
<b>TGF- β</b>	Do inglês <i>Transforming growth factor</i>
<b>TP53</b>	Do inglês <i>Tumor protein p53</i>
<b>TSG</b>	Genes Supressores Tumoriais, do inglês “ <i>tumor suppressor genes</i> ”
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b>UV</b>	Radiação Ultravioleta
<b>VEGF</b>	Do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
2.1	Carcinoma Epidermoide Oral e Lesões Potencialmente Malignas.....	21
2.2	Carcinogênese e a via de sinalização da PI3K/AKT.....	24
2.3	PI3K estrutura e função.....	27
2.4	AKT estrutura e função.....	29
2.5	FoxO3a e JNK.....	30
2.5	PTEN estrutura e função.....	32
2.5	Perda de Heterozigosidade (LOH) .....	34
<b>3</b>	<b>CAPÍTULOS</b> .....	<b>38</b>
3.1	Capítulo 1.....	39
3.2	Capítulo 2.....	68
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>95</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>102</b>
	REFERÊNCIAS.....	103
	ANEXOS.....	128

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, apresentando uma alta incidência e elevado índice de mortalidade (DANTAS et al., 2016). Em relação ao Brasil, para o biênio 2016-2017, aponta-se a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer (câncer de pele não melanoma com aproximadamente 180 mil casos novos; outros cânceres com cerca de 420 mil novos casos), sendo os tipos mais frequentes em ordem para homens: próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%), e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo de útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) representarão entre os mais prevalentes. O câncer de cavidade oral faz parte do conjunto de tumores que afetam a cabeça e o pescoço. Foram estimados cerca de 300 mil casos novos no mundo, em 2012, sendo que, desses, aproximadamente dois terços são no sexo masculino. Para a mortalidade, foram estimados 145 mil óbitos por câncer no mundo, em 2012, com cerca de 80% ocorrendo em regiões menos favorecidas (INCA, 2016). O câncer oral possui a 6ª maior taxa de mortalidade dentre os cânceres humanos, sendo o carcinoma epidermoide oral (CEO) o subtipo mais frequente (LIU et al., 2012; DANTAS et al., 2016).

Estimam-se, para o Brasil, no biênio de 2016-2017, 11.140 casos novos de câncer da cavidade oral (incluindo lábio, cavidade bucal e orofaringe) em homens e 4.350 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de boca em homens é o quinto mais frequente na Região Sul (16,86/100 mil). Na Região Centro-Oeste (7,43/ 100 mil), ocupa a sexta posição. Nas Regiões Sudeste (8,40/ 100 mil) e Nordeste (4,91/100 mil), ocupa a sétima posição. E, na Região Norte (2,20/100 mil), é o 11º mais frequente. Para as mulheres, é o 11º mais frequente na Região Sul (5,34/100 mil) e ocupa a 13ª posição nas Regiões Sudeste (2,99/100 mil) e Nordeste (1,84/100 mil). Na Região Norte (0,73/100 mil), ocupa a 14ª posição. Já na Região Centro-Oeste (2,08/100 mil), a 15ª. A última estimativa mundial apontou que ocorreriam cerca 145 mil óbitos, para o ano de 2012, decorrente de câncer de boca e lábio (INCA, 2016).

Desordens potencialmente malignas também estão associadas à carcinogênese oral, sendo que CEOs têm sido documentados em associação ou precedidos por uma lesão potencialmente maligna (LPM). Anteriormente, a definição de lesão pré-maligna aplicava-se a essas lesões que apresentavam alterações clínicas com potencial para malignizarem e tornarem, posteriormente, malignas. Observavam-se, também, que algumas dessas lesões ocorriam

frequentemente nas margens de CEOs, enquanto outras partilhavam alguns aspectos das lesões epiteliais malignas, entretanto não demonstrando invasão do tecido conjuntivo subjacente (REIBEL, 2003; HUBER, 2010). Alguns autores preferem usar o termo desordem potencialmente maligna em vez de lesão pré-maligna, uma vez que esse termo nos leva a acreditar que a lesão irá progredir irremediavelmente para uma neoplasia maligna, o que não é, de todo, verdade, visto que clinicamente, a progressão para o fenótipo maligno comumente, não é observada nas LPMs (GOMES et al., 2015; EL-NAGGAR et al., 2017; WESTRA e LEWIS, 2017). Adicionalmente, assumiu o termo ‘desordens’ em vez de ‘lesões’, já que, uma lesão potencialmente maligna implica que a lesão maligna, caso ocorra, se desenvolva no local dessa mesma lesão. No entanto, também existem condições potencialmente malignas quando a lesão maligna surge num local de tecido com aparência clínica normal (WARNAKULASURIYA, JOHNSON, VAN DER WAAL, 2007; VAN DER WAAL, 2009)

Leucoplasia, eritroplasia, eritroleucoplasia e a queilite actínica são as principais desordens envolvidas no surgimento de lesões malignas orais (EL-NAGGAR et al., 2017; WESTRA e LEWIS, 2017). Quando o desfecho de um grande número de DPMs é revisto, a frequência de transformação em lesão maligna é maior do que o risco associado a uma mucosa normal ou não alterada, ressaltando a importância do diagnóstico precoce dessas lesões para o correto tratamento e acompanhamento (WARNAKULASURIYA, 2008). Ao exame histopatológico, as DPMs demonstram, muitas vezes, diferentes graus de displasia epitelial, possibilitando prever um potencial de malignidade (ROSIN et al., 2000; WARNAKULASURIYA et al., 2008). Apesar do exame histopatológico ainda ser a ferramenta padrão ouro para avaliar as DPMs (WARNAKULASURIYA et al., 2008; LIU et al., 2012; FONSECA-SILVA et al., 2016), a acurácia dos exames clínicos e histopatológicos são, cotidianamente, ainda de difícil previsão da transformação maligna dessas lesões (WARNAKULASURIYA, JOHNSON, VAN DER WAAL, 2007; PITIYAGE et al., 2009; WESTRA e LEWIS, 2017).

A busca de marcadores preditivos e de prognóstico para o câncer continua sendo alvo de pesquisa, principalmente na carcinogênese oral, pois até então não há estes marcadores para o câncer de boca. Assim, a identificação de marcadores moleculares que possam sinalizar o comportamento e a transformação maligna são muito relevantes. Estudos recentes têm buscado associar a perda alélica ou perda de heterozigosidade (LOH – do inglês “*loss of heterozygosity*”) com uma maior predição de transformação maligna das DPM (GOMES et al., 2015; FONSECA-SILVA et al., 2016), uma vez que se mostra associada à perda funcional de genes supressores tumorais (TSG – do inglês “*tumor suppressor genes*”) (VELICKOVIC et al., 2002;

COUTO, 2011). Entretanto, permanece uma lacuna em relação a estudos que avaliem LOH em DPM e neoplasias orais.

Estudos com carcinomas orais (MAVROS et al., 2002), cânceres de cabeça e pescoço (SHAO et al., 1998) e em diversas localizações (VELICKOVIC et al., 2002; ABDULLAH et al., 2006; OKI et al., 2006; BAE et al., 2007; TOKUNAGA et al., 2007; BETTENDOTF et al., 2008; HO et al., 2009; RIZVI et al., 2012; SCHWARZENBACH et al., 2012; QUATTRONE et al., 2014; ZAITSU et al., 2015; CORREA et al., 2015) demonstraram LOH no locus 10q-23.3, onde está localizado o gene da fosfatase e homólogo de tensina deletada no cromossomo 10 (PTEN; do inglês “*phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*”). Este gene é um supressor tumoral pertencente à via PI3K/AKT, uma das mais desreguladas no câncer (GIUDICE e SQUARIZE, 2013). Seus principais substratos são PIP<sub>3</sub> (*Phosphatidylinositol triphosphate*) e o oncogene AKT (*Protein kinase B*), os quais são importantes sinalizadores para o crescimento, proliferação e sobrevivência celular (OKI et al., 2006; HU et al., 2007; SCHWARZENBACH et al., 2012; LI et al., 2014; WANG, HUANG, YOUNG, 2015). Ainda não é conhecido se a perda alélica de PTEN ocorre também em lesões malignas em estágio inicial e se este fenômeno gênico se mostra envolvido como um dos mecanismos da carcinogênese oral.

Nesse contexto, objetiva-se realizar análise de LOH em duas regiões cromossômicas de PTEN (intergênica e intragênica) em amostras de DEOs e CEOs com diferentes gradações histológicas de malignidade, e também a avaliação imunoistoquímica da proteína PTEN, a fim de avaliar se a LOH desse gene se mostra envolvida na expressão proteica em diferentes estadiamentos histológicos de DEOs e CEOs. Além disso, este estudo objetiva investigar se o processo de perda alélica ocorre de forma semelhante entre lesões malignas em diferentes estágios de malignidade bem como em lesões com o processo de malignidade instalado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### *2.1 Carcinoma Epidermoide Oral e Lesões Potencialmente Malignas*

Câncer de boca constitui em aproximadamente 3% de todas as neoplasias malignas, sendo o CEO seu subtipo mais comum (WOLFF, FOLLMAN, NAST, 2012; CHI, DAY, NEVILLE, 2015). Mesmo com os avanços no tratamento e difusão de informações sobre fatores de risco, a taxa de mortalidade ainda é alta, principalmente em países em desenvolvimento (FERLAY et al., 2015). Esse tumor representa uma neoplasia epitelial invasiva e agressiva, com graus variáveis de diferenciação escamosa e exibem propensão para desenvolvimento de metástase linfonodal (OGBUREKE et al., 2007; JAMADAR et al., 2014). Acomete preferencialmente homens acima dos 50 anos de idade, entretanto sua prevalência entre indivíduos mais jovens, com menos de 45 anos, tem aumentado (CHI, DAY, NEVILLE et al., 2015).

Desordens potencialmente malignas (DPMs) são alterações clínicas e histopatológicas que apresentam maior risco de evolução para uma neoplasia maligna (HEGARTY; HUNTER, 2016). CEOs têm sido documentados em associação ou precedidos por uma DPM (WARNAKULASURIYA, JOHNSON, VAN DER WAAL, 2007; EVERSOLE, 2009; EL-NAGGAR et al., 2017; WESTRA e LEWIS, 2017). DPMs podem apresentar alterações morfológicas e citológicas que caracterizam um quadro histopatológico de displasia epitelial oral (DEO) o qual demonstra um maior potencial de transformação maligna para CEO, quando comparado com o tecido epitelial normal (WARNAKULASURIYA, JOHNSON, VAN DER WAAL, 2007; GOODSON et al., 2017). Assim, o diagnóstico histopatológico de DEO é considerado um importante indicativo de transformação para CEO (BRENNAN et al., 2007; WARNAKULASURIYA, JOHNSON, VAN DER WAAL, 2007). Em adição, alterações cromossômicas, genômicas e moleculares, características dos carcinomas invasivos, podem também ser detectadas nas DPMs (WARNAKULASURIYA, JOHNSON, VAN DER WAAL, 2007). Dessa forma, as DEO podem constituir o primeiro passo para o desenvolvimento do CEO (WARNAKULASURIYA et al., 2008; EL-NAGGAR et al., 2017).

A leucoplasia oral (LO) é a DPM mais comum da cavidade oral, e o diagnóstico de LO é um fator de risco para o desenvolvimento de CEO (GOMES et al., 2015). Clinicamente, se apresentam como uma placa homogênea, placa irregular, nódulo esbranquiçado; podendo ser lesões únicas ou difusas, ocupando algumas vezes múltiplos sítios da mucosa (HEGARTY;

HUNTER, 2016). LOs apresentam estreita relação com o CEO em função de características clínicas comuns, além da frequência de alterações epiteliais que apresentam graus variados de atipia celular (WANG et al., 2006; WARNAKULASURIYA et al., 2008). Quando mostram algum grau de displasia, são consideradas potencialmente malignas (LINGEN et al., 2011), sendo a prevalência de LO que exibem displasia entre 16 a 45% (LEE, J. J. et al., 2006; CHI, DAY, NEVILLE, 2015). O risco de transformação maligna em cinco a dez anos é estimado em 5% para as LOs, apresentando uma taxa variável entre 0,1 e 18% (VAN DER HEM et al., 2005; RIBEIRO et al., 2010; KALAVREZOS; SCULLY, 2015). Quando as leucoplasias têm uma aparência clínica não homogênea, a possibilidade de progressão aumenta, sendo o percentual de transformação maligna de cerca de 30% (KALAVREZOS; SCULLY, 2015).

Embora as DPMs apresentem maior risco de evolução para malignidade do que o tecido normal, elas podem permanecer estáveis por tempo indeterminado e até nunca chegarem a originar uma lesão maligna (LINGEN *et al.*, 2011). Estudos recentes apontam que a taxa global de transformação maligna da LO é estimada em apenas 1-2% (MÜLLER, 2017), não ocorrendo comumente essa progressão para um fenótipo maligno (GOMES et al., 2015). Assim, o uso da nomenclatura desordens potencialmente malignas orais é justificável por reconhecer que, em algumas condições, o risco de transformação maligna é extremamente baixo e mesmo reversível (KURIBAYASHI, et al., 2015; NARAYAN e SHILPASHREE, 2016; MÜLLER, 2017).

A etiologia da LO, muitas vezes, está associada ao uso crônico do tabaco e ao hábito de mascar fumo, apesar de também ser observada em pacientes que não apresentam esse hábito, exibindo, nestes casos, uma etiologia desconhecida ou idiopática (RIBEIRO et al., 2010; NARAYAN e SHILPASHREE, 2016; SHETTY et al., 2016). Estudos apontam que a LO associada a indivíduos não fumantes adquirem um perfil mais agressivo e apresenta uma maior taxa de transformação maligna quando comparada a LO associada com o uso de tabaco. Entretanto, é difícil quantificar e qualificar os hábitos tabagistas de um paciente bem como outros fatores como o álcool, o hábito de mascar fumo e a dieta que podem estar associados à etiopatogenia dessa lesão (VAN DER WAAL et al., 2009; CARRARD et al., 2011; SHETTY et al., 2016). Fatores como presença de DEO, tipo clínico, localização, tamanho e lesões não associadas ao uso do tabaco estão associadas a um maior potencial de transformação maligna (BRENNAN et al., 2007; VAN DER WAAL et al., 2009; LEE et al., 2010; SHETTY et al., 2016).

A ertitroplasia consiste em outra DPM que apresenta um maior risco de evolução para uma neoplasia maligna. Caracteriza-se por lesão macular ou em placa, de coloração vermelha, sendo definida como uma mancha vermelha que não pode ser caracterizada clínica ou

patologicamente como nenhuma outra doença conhecida (VAN DER WAAL et al., 2009). É encontrada mais comumente em indivíduos de meia idade, como lesões únicas. A prevalência dessas lesões é mais baixa do que a de leucoplasias, com uma prevalência variável de 0,02 e 0,83%, entretanto, apresentam maior risco de transformação maligna. Em muitos casos, ao suspeitar-se clinicamente de eritroplasia, histologicamente, já são observadas alterações displásicas severas ou mesmo carcinomas (VAN DER WAAL et al., 2009; HEGARTY; HUNTER, 2016). Ocorre preferencialmente em região de assoalho de boca, bordo lateral da língua, trígono retromolar e o palato mole (REICHART e PHILIPSEN; 2005).

Nesse contexto, um dos questionamentos em relação às DPM é a identificação de quais lesões teriam um risco potencial de se transformar em câncer, visto que os achados clínicos e histopatológicos não predizem com absoluta confiabilidade a evolução das lesões. Estudos genéticos e moleculares têm sido utilizados na tentativa de determinar a evolução das LOs e ainda identificar quais lesões apresentariam uma maior probabilidade de transformação maligna (ROSIN et al., 2000; ZHANG e ROSIN, 2001; SMITH et al., 2009; CAMARA et al., 2016; REIBEL *et al.*, 2017). Pesquisas realizadas nessa área refletem a grande importância de se estabelecer de forma precoce o diagnóstico de lesões neoplásicas e, conseqüentemente, promover melhorias para o tratamento e o prognóstico dos pacientes.

Recentemente, na atualização da *4th Edition of the World Health Organization of Head and Neck Tumours: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue*, a Organização Mundial de Saúde (OMS) realizou alterações significativas na classificação das neoplasias malignas e distúrbios potencialmente malignos da cavidade oral (MÜLLER, 2017). Com base nesta, os critérios diagnósticos para a DEO foram modificados, apresentando dois sistemas de classificação, considerando as alterações citológicas e arquiteturais do epitélio da lesão e estabelecendo critérios para classificação das displasias baseados na divisão em terços da camada epitelial, onde o grau de DEO é definido como leve, moderada e grave, com displasia grave e carcinoma *in situ* considerados como sinônimos. Gale et al., em 2014, sugeriram que seria interessante a adoção de um sistema binário de classificação, de alto grau e baixo grau de displasia, semelhante ao que foi utilizado por Warnakulasuriya et al., em 2008, que busca associar a gradação histopatológica com a probabilidade de transformação maligna.

Embora existam critérios variados de classificação do risco de transformação maligna das DPM que apresentam DEO, as características clínicas e morfológicas não têm se mostrado bons preditores em relação ao risco de malignização. Tais critérios histológicos são subjetivos e geralmente não há consenso entre os patologistas. Além disso, a classificação das displasias não apresenta constante associação com a transformação maligna das DPMs (TABOR et al.,



2003; NAPIER e SPEIGHT, 2008). Desse modo, há uma busca no estudo de alterações moleculares das DEOs na tentativa de identificar biomarcadores preditores para a transformação maligna.

Em DPM há ainda uma grande discussão acerca do papel dos TSGs que possam se encontrar mutados (ROSIN et al., 2000; FARIAS et al., 2012; FONSECA-SILVA et al., 2016), sugerindo que a desregulação dos TSGs possa estar relacionada com o comportamento biológico dessas lesões e exercendo um papel importante para a patogênese e evolução dessas (TANAKA e ISHIGAMORI, 2011). Contudo, é importante ressaltar que há ainda necessidade de estudos que busquem associar as alterações em genes supressores de tumor às alterações citológicas e arquiteturais das displasias. Os aspectos morfológicos das DPM podem ser importantes preditores de modificações moleculares relacionados ao comportamento biológico destas lesões e também aos fenômenos de transformação maligna (FONSECA-SILVA et al., 2016).

## ***2.2 Carcinogênese e a via de sinalização da PI3K/AKT***

A carcinogênese é um processo complexo que envolve alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em diversos processos relacionados, envolvendo o controle do ciclo celular, a apoptose, a diferenciação, a senescência e a angiogênese, além da motilidade celular e capacidade migratória. Várias são as teorias desse processo carcinogênico, e a mais difundida é a teoria da mutação somática. Segundo esta, basicamente uma ou um grupo de células sofre mutações genéticas tornando-as potencialmente capazes de se multiplicarem de modo autônomo, escapando de todos os mecanismos de proteção do DNA. A partir daí, ocorre a expansão clonal dessas células, a qual leva a um grande acúmulo de mutações genéticas e à transformação dessas em neoplasias (PITOT, 2001; CHEN et al., 2008; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A etiologia do câncer oral é variada, não existindo um único fator causador. O etilismo, o tabagismo e as infecções pelo papiloma vírus humano (HPV) são os principais fatores de risco para esse grupo de tumores (DANTAS et al., 2016). O risco do desenvolvimento do câncer de cavidade oral atribuído ao tabagismo e etilismo pode ser de até 65%, justificado pela existência de um sinergismo entre esses dois fatores (INCA, 2016; DANTAS et al., 2016). A exposição à radiação ultravioleta (UV) mostra-se também como um importante fator de risco para o câncer de lábio (CARPENTER e SILVERMAN, 2001; INCA, 2016; MÜLLER, 2017).

Dentre as alterações genéticas observadas no desenvolvimento do câncer oral, incluímos a ativação de proto-oncogenes (por exemplo, o *CDKN2A*, o *MYC*, o *RAS*, o *PIK3CA*, e o *EGFR*) e a inativação de TSGs (por exemplo, o *p16INK4A*, o *TP53*, e o *PTEN*), essas alterações genéticas são complexas e, na maioria das vezes, estão interrelacionadas (LIU et al., 2014; CHI, DAY, NEVILLE, 2015; YE, LI, GONG, 2017). Análises moleculares de células malignas em vários estágios de progressão têm revelado alterações em TSGs e oncogenes acumuladas durante a progressão tumoral e correlacionadas com a agressividade do câncer (YOKOTA, 2000; CHEN et al., 2008; CHAVES et al., 2017).

TSGs e seus produtos proteicos agem na regulação do ciclo celular, especificamente nos pontos de checagem (*check points*), prevenindo duplicações celulares aberrantes e, conseqüentemente, atuando como fatores antitumorais (LAI, VISSER-GRIEVE, YANG, 2012). Alterações no padrão de expressão desses genes acarretam na ineficiência ou ausência da checagem do ciclo celular e, dessa maneira, permitir erros de replicação alélica, determinando ou potencializando os eventos da carcinogênese (BERGER, KNUDSON, PANDOLFI, 2011). Recentemente, vários trabalhos analisaram alterações relacionadas aos TSGs em diversos tipos de neoplasias malignas (ASHAZILA et al., 2011; BERGER, KNUDSON, PANDOLFI, 2011; CAVENEE, 2012) bem como estudos em modelos experimentais de indução neoplásica observaram alterações em nível genético e proteico nos genes *P53*, *P21* e *P16* (GONZALES-MOLES et al., 2002; BERGER, KNUDSON, PANDOLFI, 2011; CUEVAS GONZALEZ et al., 2016).

Em carcinomas de cabeça e pescoço, muitas vezes, são observadas alterações em vias de sinalização envolvendo receptores de fatores de crescimento, transdutores de sinais e fatores de transcrição que regulam a resposta ao dano do DNA, parada do ciclo celular e apoptose, produzindo alterações fenotípicas críticas para transformação e progressão (JEON et al., 2004). Diversos estudos mostraram que perdas somáticas em lócus de TSGs são capazes de alterar a expressão e função desses genes, resultando, assim, em uma susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer (LEE et al., 2010).

Desse modo, vem sendo discutido recentemente o envolvimento de diversas vias de sinalização tais como vias nas quais estão presentes os genes *P53* (CUEVAS GONZALEZ et al., 2016), *APC* (*adenomatous polyposis coli*), *DCC* (*deleted in colon cancer*) (MASSON et al., 2015), fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), receptor do ácido retinoico, receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) (JEON et al., 2004) e *PTEN* (GIUDICE e SQUARIZE, 2013).

Uma via de sinalização que vem ganhando grande destaque é a via da fosfatidilinositol 3-quinase, via PI3K/AKT/mTOR, que está frequentemente alterada em diversas neoplasias malignas, incluindo as de cabeça e pescoço (MOLINOLO et al., 2009; SQUARIZE et al., 2013), estando intimamente relacionada com metástase, angiogênese, progressão do ciclo celular, organização do citoesqueleto, crescimento e resistência ao tratamento (CLAUDITZ et al., 2013; GRIFFITH et al., 2013; PORTA, PAGLINO, MOSCA, 2014). Essa via de sinalização é crucial em muitos aspectos de crescimento celular e sobrevivência, tanto em condições fisiológicas como patológicas. É uma via tão interligada que pode ser considerada como única, interagindo também com muitas outras vias, como, por exemplo, a do *HIF* (Fator Indutor de Hipóxia) (PORTA, PAGLINO, MOSCA, 2014).

A via é ativada por meio da ligação de fatores de crescimento que se ligam à membrana plasmática celular por meio de receptores tirosina quinase também presentes na membrana da célula. Essa ligação provoca uma cascata de sinalização intracelular que começa com a ativação da molécula PI3K (*Phosphatidylinositol-3-kinase*) que, através de seu subproduto PIP3, ativa AKT (ENGELMAN et al., 2009). Uma vez fosforilada, *AKT* pode ativar mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), que regula a proliferação celular por fosforilação de P70S6 na transição da fase G1/S do ciclo. P70S6, por sua vez, fosforila a proteína S6 da subunidade 40S do ribossomo (PS6), induzindo a síntese proteica celular (FINGAR et al., 2004). Esta reação é regulada negativamente pela desfosforilação do *PTEN* (FAIVRE, KROEMER, RAYMOND; 2006; YUAN e CANTLEY, 2008).

A perda de *PTEN* culmina com a estimulação da via PI3K, promovendo, assim, a sobrevivência da célula e o crescimento tumoral (COURTNEY, CORCORAN, ENGELMAN; 2010). Quando o *PTEN* é deletado, ou está mutado ou ainda inativado, há um aumento na regulação de *AKT* por meio de efetores PI3K. Essa sobrerregulação finalmente reduz a indução apoptótica, levando à continuada sobrevivência e proliferação celular, contribuindo para a tumorigênese e predispondo para o desenvolvimento do câncer. A rede de sinalização PI3K-PTEN é crucial para uma adequada regulação da sobrevivência celular (DAHIA, 2000; YAMADA e ARAKI, 2001; ALYASIRI et al., 2012; ANGADI e KRISHNAPILLAI, 2012).

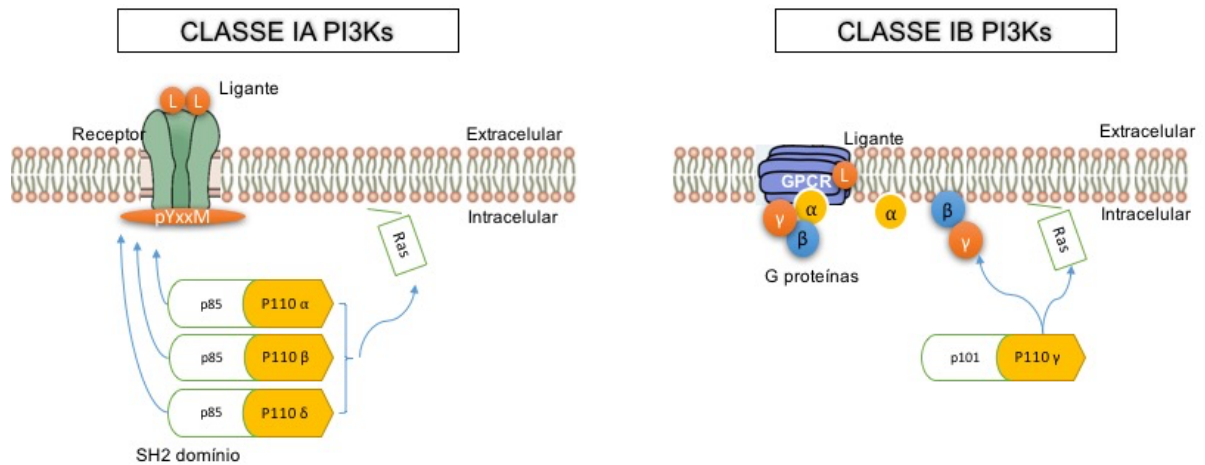
Alterações na sinalização de PTEN, seja através da modificação da dose celular ou inibição direta de sua atividade enzimática, pode afetar muito o comportamento celular. É identificado dois mecanismos recentes e distintos que regulam a sinalização PTEN intracelular. Primeiro, uma variante translacional de PTEN, denominada inicialmente PTEN-Long, e posteriormente PTEN-L, que altera a dosagem de PTEN celular. Segundo, uma proteína que interage com PTEN, o fator 2 de permuta de Rac fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato dependente

(P-REX2; do inglês “*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 2*”), que inibe a atividade de PTEN e regula a sinalização PI3K estimulada pela insulina e o metabolismo da glicose por meio nucleotídeos Rac guanina (HODAKOSKI et al., 2015).

### **2.3 PI3K estrutura e função**

A proteína PI3K pertence à família de lipídios-quinases presentes no meio intracelular (FRESNO VARA et al., 2004; GIUDICE e SQUARIZE, 2013) e são divididos em 3 classes (Classe I, Classe II e Classe III), de acordo com seus achados estruturais, distribuição tecidual, mecanismos de ativação, função e substratos lipídicos específicos in vivo (GIUDICE e SQUARIZE, 2013). A classe I de PI3K é constituída por heterodímeros compostos de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade adaptadora/reguladora (p85) (FRESNO VARA et al., 2004). Existem ainda as isoformas da classe I de PI3K, que são compostas tanto por isoformas de p110 (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  e p110 $\delta$ , codificadas respectivamente pelos genes *PIK3CA*, *PIK3CB* e *PIK3CD*) (GIUDICE e SQUARIZE, 2013), quanto de p85 (p50 $\alpha$ , p55  $\gamma$ , p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , codificado pelos genes *PIK3R*, *PIK3R2* e *PIK3R3*) (TZENAKI e PAPAKONSTANTI, 2013; GIUDICE e SQUARIZE, 2013) (Figura 2.1). A ligação da subunidade p85 com a subunidade 110 promove sua estabilização (GIUDICE e SQUARIZE, 2013).

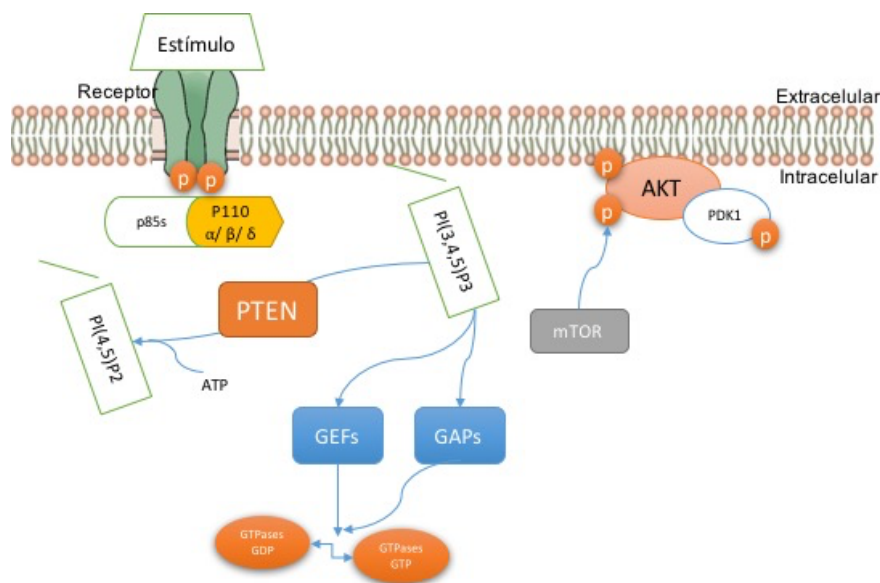
Em mamíferos, a Classe I das PI3Ks é dividida em dois grupos, Classe IA e Classe IB, com base em diferenças estruturais e funcionais (FRESNO VARA et al., 2004; GIUDICE e SQUARIZE, 2013). A subclasse IA é ativada por RTKs (*Receptors Tyrosine Kinases*) como EGFR, FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) e IGF-1R (*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*) (GIUDICE e SQUARIZE, 2013). A subclasse IB é ativada por receptores acoplados à proteína G (FRESNO VARA et al., 2004) (Figura 2.1). Todas as subunidades catalíticas da Classe I de PI3K contém domínios de ligação para Ras GTPases e a ligação desses domínios a certas proteínas RAS contribui para a sua ativação (JIMENÉZ et al., 2002).



**Figura 2.1:** Estrutura molecular e mecanismos de ativação da Classe IA e Classe IB de PI3K.  
 Fonte: Própria.

A via PI3K tem início quando suas classes são ativadas. A classe IA torna-se ativa quando há a ligação de um ligando a um receptor (por exemplo, RTK, EGFR, FGFR ou IGF-1R) localizado na membrana plasmática da célula. Isto promoverá a dimerização do receptor e a auto fosforilação de tirosinas (Y) que estão localizadas em motivos (pYxxM) (Figura 2.1). Uma vez ativados e presentes na membrana plasmática, os subprodutos da classe IA de PI3K irá fosforilar primariamente PIP2 (*phosphatidylinositol-4,4-biphosphate*) gerando o produto PIP3 (PORTA, PAGLINO, MOSCA; 2014). A geração de PIP3 leva ao recrutamento, também para a membrana plasmática, de proteínas adaptadoras e efetoras que possuem o domínio PH (pleckstrin homology domain), dentre as quais podemos citar pequenas GTPases, como o GEFs (*Guanosine Nucleotide Exchange Factors*) e GAPs (*GTPases-Activating Proteins*), além de PDK1 (*Kinase-3'-phosphoinositide-dependent kinase 1*) e AKT/PKB (FRESNO VARA et al., 2004) (Figura 2.2).

A via PI3K possui ainda diversas outras repercussões nas células por meio da ativação de AKT, a qual regula uma série de processos envolvidos na sobrevivência da célula e na progressão do ciclo celular (PORTA, PAGLINO, MOSCA; 2014).



**Figura 2.2:** Esquema simplificado mostrando a ativação dos subprodutos da Classe IA e as múltiplas ações celulares da via PI3K.

Fonte: Própria.

#### 2.4 AKT estrutura e função

AKT é também conhecida como proteína quinase B, por manter algumas similaridades, em seu domínio catalítico, com as proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), e sua estrutura proteica é formada por uma cadeia N-terminal, um domínio catalítico e uma cadeia C-terminal. Foram isolados 3 membros dessa família (AKT1, AKT2 e AKT3), que são codificados por diferentes genes, possuindo mais de 80% de similaridade entre as suas cadeias de aminoácidos. Ativação de AKT1 parece ser predominante em diferentes tipos de neoplasias (NICHOLSON e ANDERSON, 2002). Quando receptores de fatores de crescimento são estimulados, a via PI3K é ativada, gerando a produção de PIP<sub>3</sub> na membrana plasmática, o qual desencadeia a translocação de AKT do citoplasma para a membrana e se liga com o domínio PH de AKT (SONG, OUYANG, BAO; 2005).

Fisiologicamente, AKT controla diversas funções celulares, como crescimento, sobrevivência, proliferação e metabolismo (GONZALEZ e MCGRAW, 2009). Os membros da família de AKT exercem estas funções a depender do tipo celular (FRESNO VARA et al., 2004; GONZALEZ e MCGRAW, 2009; MADHUNAPANTULA e ROBERTSON, 2011), o que explica como AKT controla tantas funções de modo específico e direcionado a cada célula (GONZALEZ e MCGRAW; 2009). AKT1 possui papel crítico na sobrevivência celular, AKT2 exerce ação central na manutenção da homeostase da glicose e AKT3 atua no desenvolvimento

cerebral, uma vez que camundongos nocauteados nesse gene desenvolveram prejuízos no crescimento cerebral (GAROFALO et al., 2003).

No câncer, AKT encontra-se superativado (GONZALEZ e MCGRAW; 2009), o que o leva a modular, de forma mais intensa, vários fenômenos que são característicos em células cancerígenas (FRESNO VARA et al., 2004; SONG, OUYANG, BAO, 2005; GONZALEZ e MCGRAW; 2009; MADHUNAPANTULA e ROBERTSON, 2011) (Figura 2.2). Mecanismos que levam à hiperativação de AKT são: mutações em seus reguladores PI3K e PTEN, superexpressão do gene AKT/PKB (por aumento do número de cópias ou mutações pontuais ativas no próprio AKT), deleção ou regulação negativa (como PTEN) e expressão alterada de proteínas de interesse (TCL1, HSP90, APPL1 e RasGAP). A atividade de AKT pode ser também regulada por modificações pós-transcricionais, como fosforilação, ubiquitinação e também interações físicas com proteínas efetoras como Hsp90 (*Heat shock protein 90*) e Pin1 (*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1*) (GONZALEZ e MCGRAW; 2009; MADHUNAPANTULA e ROBERTSON; 2011).

As diferentes isoformas de AKT são superativadas em certos tipos de câncer (GONZALEZ e MCGRAW; 2009; MADHUNAPANTULA e ROBERTSON; 2011), sugerindo que em alguns casos as específicas isoformas de AKT levam a transformação celular maligna (MADHUNAPANTULA e ROBERTSON; 2011). A amplificação do gene AKT1 tem sido relatada em cânceres gástricos (STAAL, 1987), já de AKT2 foi relacionada a cânceres de ovário e pâncreas (CHENG et al., 1996; MADHUNAPANTULA e ROBERTSON; 2011) e de AKT3 a melanomas (MADHUNAPANTULA e ROBERTSON; 2009). O mecanismo molecular que dita a especificidade das isoformas de AKT nesse contexto ainda é desconhecida (GONZALEZ e MCGRAW; 2009).

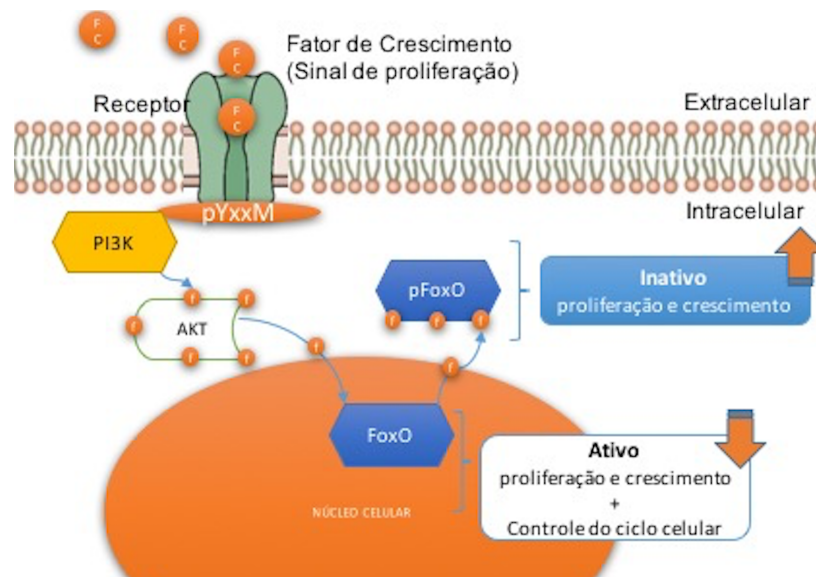
## **2.5 FoxO3a e JNK**

Em resposta à insulina ou fatores de crescimento (por exemplo: VEGF), a via PI3K/AKT é ativada, induzindo a fosforilação inibitória de seu principal substrato, às proteínas FoxO (*Forkhead Box Class O*), sendo essas já estudadas em cânceres de mama, tireóide, cervical e próstata (NICHOLSON e ANDERSON, 2002; GREER e BRUNET, 2008).

FoxO é um dos principais alvos de p-AKT e uma vez fosforilado por esta proteína perde sua função supressora tumoral pois é translocado do núcleo para o citoplasma, perdendo a ligação com genes indutores de morte celular presentes no núcleo (Figura 2.3). P-AKT reduz

ainda a habilidade de FoxO ligar-se ao DNA e aumenta a sua degradação (LAM, FRANCIS, PETKOVIC; 2006).

Fosforilação das proteínas FoxO induzida pela via PI3K/AKT ativada induz a sua ligação às proteínas chaperonas 14-3-3, sendo sequestradas para o citoplasma (onde são incapazes de regular a expressão gênica) e posteriormente degradadas pela via ubiquitina-proteassoma (HUANG e TINDALL, 2007).



**Figura 2.3:** Esquema simplificado mostrando a ativação de FoxO e as múltiplas ações celulares da via PI3K. Fonte: Própria.

FoxO citoplasmático pode ser realocado no núcleo pela presença de JNK (*Jun-N-terminal kinase*) ativado por estresse, resultando em aumento da atividade transcricional de FoxO (LAM, FRANCIS, PETKOVIC; 2006). Essas proteínas modulam a expressão de genes envolvidos na transição do ciclo celular, reparo do DNA, defesa diante de estresse oxidativo e longevidade celular, portanto tendo importante papel na supressão tumoral (HUANG e TINDALL, 2007). JNK também tem sido responsável pela fosforilação de proteínas 14-3-3, resultando na liberação de fatores de transcrição ligados ao FoxO (LAM, FRANCIS, PETKOVIC; 2006). Outras atividades antitumorais de JNK envolvem a indução da apoptose (BODE e DONG, 2007) e vigilância tumoral através de células TCD8+ (WESTON e DAVIS, 2007).

O retorno dos fatores de transcrição FoxO para a localização nuclear tem sido reportado em situações de estresse oxidativo e relacionado à via JNK (HUANG e TINDALL, 2007). Tem sido mostrado que JNK fosforila proteína ligada ao FoxO no citoplasma, lançando FoxO para dentro do núcleo e possibilitando sua realização de funções antitumorais na célula (NIELSEN



et al., 2008). A ativação JNK (pJNK) pode responder a fatores ambientais, como à radiação UV, como demonstrado por Wang et al (2012), em seu estudo envolvendo cultura de células expostas à UV, observando uma ativação de JNK e inativação de AKT, levando a translocação nuclear de FoxO3a.

A proteína JNK é codificada por três genes (*JNK1*, *JNK2*, *JNK3*) e sob a presença de vários estímulos (estresse oxidativo, UV, citocinas), há a ativação de MAPK quinases (MAPKK) as quais fosforilam JNK em resíduos tirosina (Tyr) e treonina (Thr). Uma vez fosforilado, pJNK é translocado para o núcleo onde pode regular a atividade de múltiplos fatores de transcrição (SEHGAL e RAM, 2013). Entretanto, uma resposta celular contraditória tem sido atribuída a JNK uma vez que se mostra envolvido com o aumento da proliferação e sobrevivência celular. O papel dual de JNK na carcinogênese tem sido atribuído a ativação de uma ampla gama de diferentes substratos que dependem do estímulo específico para a sua ativação, do tipo celular e de aspectos temporais (BODE e DONG, 2007).

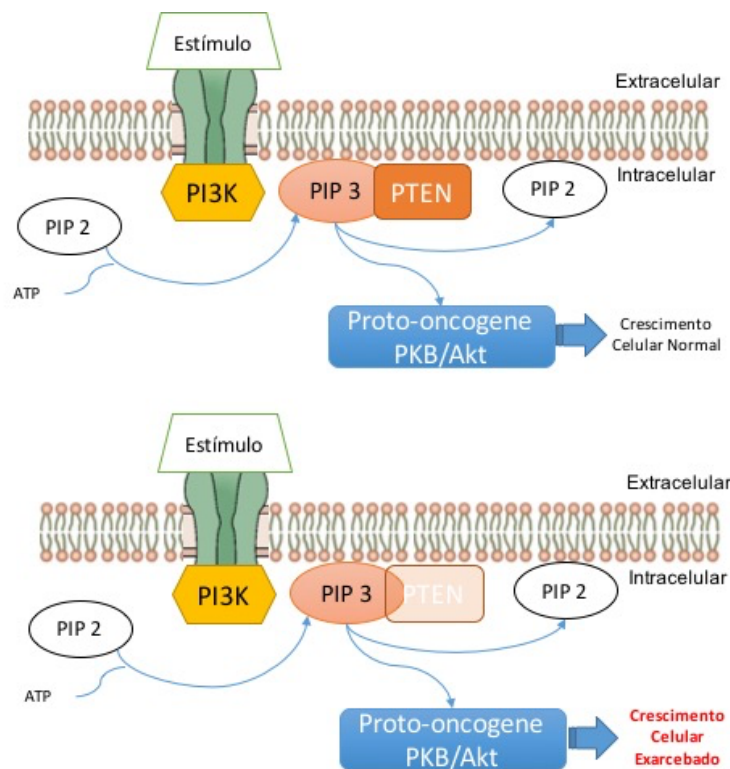
## **2.6 PTEN estrutura e função**

*PTEN* é um dos principais genes responsáveis pela progressão de alguns cânceres, incluindo CEOs (SNIETURA et al., 2012), e age como antagonista ao PI3K devido a desfosforilação de PIP<sub>3</sub> a PIP<sub>2</sub>. Mutações, hipermetilação e silenciamento por microRNAs podem diminuir a expressão desse gene e contribuir para hiperativação da via PI3K/AKT nas neoplasias. O gene *PTEN*, também conhecido por MMAC1 (*Mutated in Multiple Advanced Cancer 1*) e TEP1 (*Telomerase Protein Component 1*) codifica uma proteína composta por 403 aminoácidos que contém um domínio fosfatase N-terminal, um domínio C2 e uma região caudal C-terminal que contém múltiplos sítios de fosforilação. O *PTEN* foi isolado e identificado inicialmente como um gene supressor tumoral em neoplasias de mama e em glioblastomas, apresentando-se mutado e com sua expressão alterada em neoplasias malignas tanto em origem hereditária como casos espontâneos em variados tipos de câncer (YUAN e CANTLEY, 2008).

*PTEN* também contém duas sequências PEST e um domínio PDZ na região caudal e esses elementos são indispensáveis para a função de supressor tumoral. A função das sequências PEST é segmentar as proteínas com meia vida intracelular curta para degradação proteica. A deleção dessas sequências no *PTEN*, no entanto, leva à diminuição da expressão da proteína (SIMPSON e PARSONS, 2001).

O domínio fosfatase tem características que se assemelham às fosfatases de

especificidade dual, que são capazes de desfosforilar tanto os resíduos serina e treonina, quanto os de tirosina. Apesar de possuir especificidade dual, seu principal substrato *in vivo* é o PIP3, um produto direto da atividade PI3K (ANGADI e KRISHNAPILLAI, 2012). A ativação de PI3K por sinalizações dependentes dos fatores de crescimento leva à síntese de PIP3, que é desfosforilado por PTEN a PIP2 (SQUARIZE et al., 2013). A presença do PTEN, portanto, mantém os níveis de PIP3 baixos, enquanto que sua ausência promove o aumento da concentração de PIP3 e da sinalização PI3K/AKT (Figura 2.4).



**Figura 2.4:** Representação esquemática do papel de *PTEN* como regulador da via PI3K. *PTEN* desfosforila a posição D3 de PtdIns-3,4,5-P3 (PIP3,4,5), reduzindo seus níveis na célula. Esta ação afeta muitos processos celulares diferentes. AKT, uma serina/treonina quinase, está envolvida na regulação da transcrição, tradução e apoptose.

Fonte: Própria.

Mutações somáticas, supressão gênica ou silenciamento epigenético que levam à perda de *PTEN* têm sido relatadas em uma variedade de lesões potencialmente malignas e cânceres humanos, incluindo câncer de próstata, mama, do endométrio, tireoide, melanoma, leucemia, linfoma e CEO (ALYASIRI et al., 2012; ANGADI e KRISHNAPILLAI, 2012; SNIETURA et al., 2012). Adicionalmente, mutações hereditárias no *PTEN* podem ocasionar síndromes autossômicas dominantes, e a perda de um alelo do *PTEN* contribui para o crescimento de tumores, entretanto, experimentos em modelo animais evidenciam que *PTEN* é haploinsuficiente, ou seja, a perda de ambos os alelos é incompatível com a vida (YUAN e

CANTLEY, 2008; COUTO, 2011; MILELLA et al., 2015). Em muitas neoplasias, a supressão do PTEN coopera com outras instabilidades genéticas, contribuindo com a tumorigênese e, assim, pode até determinar um comportamento clínico mais agressivo do tumor (SNIETURA et al., 2012).

Em neoplasias malignas, a LOH pode promover a inativação de PTEN, levando ao aumento das concentrações de PIP3, ativando as proteínas fosfatidilinositol kinase dependente 1 (PDK-1), que leva à fosforilação e ativação do AKT. O pAKT em conjunto com as moléculas GTPase-GAP e Rheb1 ativam o mTOR (MOLINOLO et al., 2009). Estudo com linhagens celulares de CEOs silenciadas por meio de siRNA (small interfering RNA) para o gene PTEN mostraram que este gene é importante para o controle da transição epitélio-mesênquima uma vez que foi detectado maiores taxas de proliferação, invasividade bem como expressão de vimentina e TGF- $\beta$  nas linhagens celulares silenciadas para PTEN quando comparado ao grupo controle e negativo para o silenciamento desse gene (LU et al., 2016). Won et al., em 2016, detectaram que a perda de LOH no gene *PTEN* foi significativamente mais frequente em CEOs do que cânceres de orofaringe. Para Squarize et al., em 2013, a expressão reduzida ou a inativação de PTEN estão envolvidos na progressão de cânceres de cabeça e pescoço, sendo este gene pode propiciar novo alvo molecular no tratamento de pacientes com essas neoplasias malignas.

## **2.7 Perda de Heterozigosidade (LOH)**

A perda de heterozigosidade é uma alteração genética, na qual há perda de um ou ambos alelos de uma determinada região cromossômica específica presente em células sem alteração histopatológica. Essas alterações advêm de fenômenos que podem estar associados à diferença entre o tecido normal e tumoral (THIAGALINGAM et al., 2001; LI et al., 2004). A análise de LOH permite identificar, através da comparação entre o DNA oriundo de tecido normal e o DNA de uma determinada patologia, as alterações no balanço alélico presentes no tecido alterado, seja um tumor ou outra doença. Assim, a análise de LOH permite identificar, por meio da comparação entre DNA normal e tumoral, alterações no balanço alélico de neoplasias e lesões potencialmente malignas (VAN HOUTEN et al., 2000; CORREA et al., 2015; FONSECA-SILVA et al., 2016; MIYAHARA et al., 2017).

A LOH pode ocorrer por meio de deleções de regiões gênicas, conversão gênica, recombinação, duplicação e até de perda cromossômica, resultando em modificações na função normal da célula, que poderá conduzir ao crescimento neoplásico e à transformação maligna

(BOLAND et al., 1998; VAN HOUTEN et al., 2000; SZUKALA et al., 2006; NAKAMURA et al., 2009; SONG et al., 2010; GOMES et al., 2015). Perdas somáticas em locus de genes supressores de tumor são capazes de gerar instabilidades genéticas com consequente alteração da expressão e função desses genes, resultando em uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer (BOLAND et al., 1998; ZHANG e ROSIN, 2001; ASHAZILA et al., 2011; BERGER, KNUDSON, PANDOLFI, 2011).

Em 1973, Comings hipotetizou que o mecanismo da LOH poderia ser um passo crucial para o desenvolvimento de neoplasias humanas. Ainda na década de 1970, Knudson mostrou que alterações genéticas, como mutações, podem ser um dos passos importantes para a completa perda de um gene supressor de tumor. De acordo com esse modelo de supressão tumoral, conhecido como “*Two-hit*”, a inativação de um TSG requer alterações genéticas nos dois alelos (KNUDSON, 1971). Porém, novos estudos mostraram que a LOH é um evento que pode estar associado a um estado de haploinsuficiência gênica. Portanto, a perda ou inativação de apenas um único alelo pode ser um fator importante para o comprometimento funcional de um gene supressor de tumor, o que pode induzir ao câncer (BERGER, KNUDSON, PANDOLFI; 2011).

Recentemente, estudos moleculares vêm sendo desenvolvidos para rastreamento de possíveis genes envolvidos no processo de carcinogênese oral (VAN HOUTEN et al., 2000; CHOI e MYERS, 2008; PITIYAGE et al., 2009; SMITH et al., 2009; ZHANG et al., 2012; GOMES et al., 2015). Tais alterações podem estar associadas à redução ou ausência de expressão de TSGs e, conseqüentemente, à potencialização dos fenômenos de transformação maligna (SMITH et al., 2009; PITIYAGE et al., 2009; BERGER, KNUDSON, PANDOLFI, 2011). Assim, LOH parece estar associada aos processos de iniciação tumoral por meio de alterações no padrão de expressão gênica ou mesmo da inativação de genes supressores de tumor (ZHANG e ROSIN, 2001; PITIYAGE, G. et al, 2009; COUTO, 2011; MELILLA et al., 2015). Recentemente, foi sugerido que a LOH poderia estar associada à progressão de leucoplasias orais e, conseqüentemente, aos processos de transformação maligna (MAO et al., 1996; ROSIN et al., 2002, WANG et al., 2006; ZHANG et al., 2012; GOMES et al., 2015; FONSECA-SILVA et al., 2016). Assim, as perdas alélicas nessas regiões são alvos atrativos para o estudo que buscam prever o comportamento biológico das DPM, bem como do seu processo de transformação maligna para um CEO (ZHANG e ROSIN, 2001; ROSIN et al., 2002).

A LOH pode ser detectada por diferentes métodos, incluindo: análise de marcadores de microssatélites, análise de cariótipo, hibridação *in situ* (FISH), análise de polimorfismos (SNP

- *single-nucleotide polymorphism*) e hibridação comparativa do genoma (VELASCO et al., 2008; COUTO, 2011; MILELLA et al., 2015). Entretanto, análise a partir da amplificação de microssatélites por meio da técnica da PCR é uma das mais utilizadas atualmente. Os microssatélites são definidos como segmentos de DNA que apresentam sequências de nucleotídeos constituídos por pequenas sequências repetitivas, as quais se repetem em tipo, ordem e número variado, altamente polimórficas na população e susceptíveis a erros durante a replicação do DNA (LI et al., 2004; MIGALDI et al., 2008; COUTO, 2011). Essas sequências estão dispersas pelo genoma e estão localizadas principalmente em regiões não codificadoras, apresentam uma característica marcante na distribuição desses elementos estruturais do DNA, que é o comprimento fixo de segmentos de DNA para cada indivíduo, sugerindo uma variação individual característica, favorecendo a sua utilização como confiável marcador de DNA (LI et al., 2004; BOLAND e GOEL, 2010).

As regiões microssatélites encontram-se distribuídas por todo o genoma humano, e algumas regiões cromossômicas como 3p, 9p, 11p, 17p são relatadas na literatura como deletadas em uma série de neoplasias como câncer de mama, pulmão, melanoma, carcinomas de cabeça e pescoço e ameloblastomas (FIELD et al., 1995; ROWLEY et al., 1996; MIGALDI et al., 2008; SINHA et al., 2008). Estudos apontam que os microssatélites podem ter um grande potencial para predizer o risco de desenvolvimento dos tumores, e que a LOH é um dos importantes eventos para a inativação de um gene supressor de tumor levando ao crescimento neoplásico (VAN HOUTEN et al., 2000; COLLIN-CHAVAGNAC et al., 2010; BERGER, KNUDSON, PANDOLFI, 2011). Algumas destas alterações podem ser identificadas por meio da análise de marcadores de regiões microssatélites, próximos a TSGs (MIGALDI et al., 2008; VELASCO et al., 2008). Esses segmentos de DNA repetitivos têm sido reconhecidos pelas suas importantes ações na organização da cromatina, recombinação, deleção de DNA e pela regulação da atividade dos genes (LI et al., 2004).

Spafford et al., em 2001, identificaram alterações genéticas como a LOH em lesões malignas da cavidade oral, não sendo identificado tais alterações em pacientes que apresentavam a cavidade oral livre de lesões orais, indicando a alta especificidade desse método. Estudos de avaliação da LOH em CEOs e de região de orofaringe, identificaram LOH nas regiões 3p, 4q, 5q, 8p21–23, 11q13, 11q23, 13q, 14q, 17p, 18q e 22q (GLAVAC et al., 2003; AHMED, IDRIS, IBRAHIM, 2003; LEE et al., 2010). Nunes et al., em 2000, realizaram uma análise de microssatélites de células provenientes da cavidade bucal de pacientes com câncer de boca e orofaringe por citologia esfoliativa, e encontraram LOH em 84% das amostras.

Semelhante a outros tumores malignos sólidos, carcinomas de cabeça e pescoço exibem heterogeneidade molecular (DIWAKAR et al., 2005; WANG et al., 2006; BERMAN, GAUTHIER, TLSTY, 2010). Alguns destes estudos têm correlacionado a LOH com um pior prognóstico do tumor (FIELD et al., 1995; BREMMER et al., 2008; LEE et al., 2010; IDOATE et al., 2014). O papel do PTEN nos CEOs ainda não é totalmente claro e mostra muitas discrepâncias. Chen et al. (2000) e Cohen et al. (2011) não demonstraram qualquer deleção homozigótica nesse gene e concluíram que as alterações no *PTEN* são raras nos CEOs. No entanto, uma ausência da imunexpressão da proteína PTEN já foi relatada por diversos autores (ALYASIRI et al., 2012; ANGADI e KRISHNAPILLAI, 2012; WON et al., 2012; SQUARIZE et al., 2013), o que indica que a taxa de inativação de *PTEN* no nível da proteína parece ser mais comum do que aquele reconhecido em nível gênico.

Estudos têm validado a LOH como preditores de risco de transformação maligna de DPM (MAO et al., 1996; LIPPMAN e HONG, 2001; ZHANG et al., 2012). Zhang et al., em 2012, realizaram um estudo de coorte onde foi evidenciado que as lesões com LOH em 3p e/ou 9p apresentam maior risco de transformação maligna em comparação com lesões que retém 3p e 9p. Fonseca-Silva et al., em 2016, avaliaram LOH em áreas de DEO através de um painel de 11 marcadores de microssatélites localizados nos cromossomos 3, 9, 11 e 17; observando que alterações arquitetônicas e celulares em DPM possuem padrões diferentes de LOH, ressaltando a necessidade de estudos adicionais. Gomes et al., em 2015, observaram padrões distintos de LOH independentemente do grau histopatológico, fornecendo evidências de heterogeneidade molecular inter e intra-lesional em leucoplasias orais. Assim, a heterogeneidade molecular precisa ser abordada visando encontrar genes cancerígenos específicos na quimioprevenção da transformação maligna de DEO.

A análise de LOH nos marcadores microssatélites próximos a TSGs pode ser um meio de identificar alterações genéticas, como a perda de um alelo desses genes. Essas alterações são capazes de inativar os TSGs que tem um importante papel no controle da proliferação durante o ciclo celular (VELASCO et al., 2008; VAN HOUTEN et al., 2000; ABOU-ELHAMD et al., 2008). Soma-se o fato de que a identificação precoce de alterações como a LOH pode ser útil no planejamento e possível predição de comportamento de DPM na cavidade oral (ABOU-ELHAMD et al., 2008; ACCURSO et al., 2011).

### 3 CAPÍTULOS

Esta tese está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato e exige certificação de línguas. Essa pesquisa foi submetida à apreciação e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará / PROPESQ, sob protocolo de No 94.432 (Anexo C), sendo o projeto de pesquisa intitulado de “Estudo Imuno-molecular da Via de Sinalização de PI3K/AKT no Câncer Oral”. Assim sendo, esta tese é composta de dois capítulos contendo: um artigo científico previamente publicado no periódico “*Oral Diseases*” (Anexo D), em idioma inglês devidamente certificado (Anexo E), e outro capítulo em processo de submissão no periódico “*Journal of Oral Pathology and Medicine*”, conforme descrito abaixo:

#### **Evaluation of the p-AKT, p-JNK and FoxO3a function in oral epithelial dysplasia.**

FN Chaves, TMM Bezerra, PG de Barros Silva, FAF Oliveira, FB Sousa, FWG Costa, APNN Alves, KMA Pereira. *Oral Diseases*. Status: Publicado. Doi: doi:10.1111/odi.12623.

#### **Loss of heterozygosity and immunoexpression of PTEN in oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinoma.**

Karuza Maria Alves Pereira, Ph.D; Filipe Nobre Chaves, DDS, MsC, PhD Student; Thamara Manoela M Bezerra, DDS, MsC, PhD Student; Debora C Morais, DDS, MsC, PhD Student; Sara Ferreira S Costa, DDS. MsC Student; Ana Paula N Alves, DDS, MsC, PhD; Carolina C Gomes, DDS, MsC, PhD; Ricardo S Gomez, DDS, MsC, PhD; Vanessa F Bernardes, DDS, MsC, PhD. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. Status: Processo de Submissão iniciado em novembro de 2017.

**3.1 Capítulo 01:** Evaluation of the p-AKT, p-JNK and FoxO3a function in oral epithelial dysplasia.

**Title Page**

**Original Article**

Evaluation of the p-AKT, p-JNK and FoxO3a function in the oral epithelial dysplasia malignance.

**Running Head**

AKT, JNK and FoxO3a in oral epithelial dysplasia.

**Authors and name affiliations**

Filipe Nobre Chaves<sup>1</sup>, Thâmara Manoela Bezerra Marinho<sup>1</sup>, Paulo Goberlânio de Barros Silva<sup>1</sup>, Francisco Artur Forte Oliveira<sup>1</sup>, Fabrício Bitú Sousa<sup>1</sup>, Fábio Wildson Gurgel Costa<sup>1</sup>, Ana Paula Negreiros Nunes Alves<sup>1</sup>, Karuza Maria Alves Pereira<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Department of Dental Clinic, Division of Oral Pathology, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

\*Correspondence author: PhD. MSc. DDS. Karuza Maria Alves Pereira

Division of Oral Pathology

Department of Clinical Dentistry

School of Dentistry

Federal University of Ceará

Alexandre Barauna Street, 949, Rodolfo Teofilo,  
60430-160, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Phone 1/Fax Number: +55 85 3366 8421.

Phone 2: +55 85 8705 7151.

E-mail: [karuzaalves@yahoo.com.br](mailto:karuzaalves@yahoo.com.br)



**Abstract**

**OBJECTIVES:** To evaluate the expression of p-AKT, p-JNK, FoxO3a and KI-67 in samples of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) and Oral Epithelial Dysplasias (OEDs) to understand their possible involvement in the malignant transformation process of oral lesions.

**MATERIALS AND METHODS:** Tissue samples of 20 cases of OSCCs, 20 OEDs and X normal oral mucosa were subjected to immunohistochemistry reactions for anti-p-Akt, anti-p-JNK, anti-FoxO3a and anti-Ki-67 antibodies. It was analyzed quantitative (number of immunostained cells) and qualitative (immunostaining intensity) parameters in different cell immunostaining sublocations.

**RESULTS:** Nuclear p-AKT was observed significantly greater immunostaining in CCEOs ( $21.2 \pm 19.0$ ) than in dysplasias ( $7.9 \pm 8.1$ ) and control ( $1.8 \pm 4.7$ ) ( $p = 0.002$ ). Immunostaining of strong nuclear p-JNK was greater in controls ( $48.3 \pm 13.7$ ) than in OEDs ( $11.0 \pm 10.3$ ) and OSCCs ( $1.1 \pm 1.3$ ) ( $p < 0.001$ ). Strong nuclear immunostaining of FoxO3a proved to be absent in OSCCs ( $0.0 \pm 0.1$ ) with little staining on dysplasias ( $3.2 \pm 5.4$ ) and increased expression in controls ( $13.5 \pm 4.8$ ) ( $p < 0.001$ ). Immunostaining of strong nuclear ki-67 was grater in OSCCs ( $48.1 \pm 49.6$ ) than in OED ( $11.8 \pm 10.6$ ) and controls ( $1.9 \pm 2.0$ ) ( $p < 0.001$ ).

**CONCLUSIONS:** Malignant process of DEOS in this research may involve the same mechanisms of established malignant lesions.

**KEYWORDS:** oral squamous cell carcinoma; oral epithelial dysplasia; immunohistochemistry; p-AKT; p-JNK; FoxO3a.

## Introduction

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) and pharyngeal cancer represent the sixth most common solid cancers around the world (Warnakulasuriya, 2008). Most patients with OSCC present with locally advanced disease and need multimodality therapy that may include surgery, radiotherapy, chemotherapy, and molecular therapy (Warnakulasuriya, 2008; Scully and Bagan, 2009). Thus, to understanding the molecular pathways of OSCC carcinogenesis and progression would be helpful in improving the diagnosis, therapy, and prevention of this disease (Scully and Bagan, 2009).

It is widely accepted that OSCC can arise from a premalignant lesion (LPM) (Scully and Bagan, 2009). However, not all LPMs become malignant, and oral epithelial dysplasia (OED) histopathology is an important predictor of malignancy (Warnakulasuriya *et al*, 2008; Scully and Bagan, 2009). Currently, the association between the degree of oral dysplasia and malignant transformation remains debatable (Warnakulasuriya *et al*, 2008). Additional study is therefore necessary to improve the histological grading of dysplasias. Furthermore, a better understanding of changes in molecular and biochemical processes in dysplasias may help identify specific biomarkers that, together with histological parameters, can lead to a more accurate diagnosis of the risk of malignant transformation of these lesions.

The PI3K / AKT signaling pathway is one of the most frequently deregulated pathways in cancer (Lam *et al*, 2006). The constant activation of this pathway in cancer is often a consequence of increased expression of genes that encode either class I PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) subunits (e.g., 110 $\alpha$ ) or AKT (protein kinase B), or is a result of genetic mutations that inhibit negative regulators of the PI3K / AKT pathway such as PTEN (phosphatase and tensin homologue) (Lam *et al*, 2006).

FoxO (forkhead box O) is a major target of p-AKT. Once it is phosphorylated, it loses its tumor suppressor function because it is translocated from the nucleus to the cytoplasm, induce cell death. P-AKT also reduces the ability of FoxO to bind to DNA and enhances its degradation. Cytoplasmic FoxO can be relocated to the nucleus by the presence of JNK (c-Jun N-terminal kinase), which is activated by stress, resulting in increased FoxO transcriptional activity (Lam *et al*, 2006). JNK is also responsible for phosphorylation of 14-3-3 chaperone proteins. This function results in the release of transcription factors linked to FoxO, as these proteins retain FoxO in the cytoplasm (Van der Heide *et al*, 2004; Lam *et al*, 2006). In OSCC, it has been suggested that FoxO3a activity can be important in malignant transformation and that tumor progression occurs through CDK4/6 and cyclin D1 inhibition, as well as p27 and Bim accumulation (Fang *et al*, 2011).

Genetic and epigenetic alterations occur during malignant transformation, but the prognostic meaning of the earliest genetic changes in malignancy remain unclear, as the progression of genetic damage over time has not yet been demonstrated (Warnakulasuriya *et al*, 2008). In addition, histopathology, even today, is the established method for assessing the risk of premalignant lesions, indicating the need for better models of biological risk (Massarelli *et al*, 2005). Given the above, the current study sought to understand the malignant transformation process of OEDs through the expression of biomarkers involved in the PI3K/AKT pathway using immunohistochemistry. Comparisons regarding the immunoreactivity of these biomarkers with OSCCs were also carried out.

## **Materials and Methods**

This study consisted of an observational, analytical and cross-sectional study, using the diagnosis and immunomolecular analysis of malignant and premalignant lesions. We analysed 20 cases of OEDs, and 20 cases of OSCCs and 5 cases of normal oral epithelium (NOE). All samples were embedded in paraffin and obtained from incisional biopsies from patients of the Outpatient Stomatology Clinic of the Federal University of Ceará - Sobral Campus. Samples were collected from January 2012 to December 2015. The Research Ethics Committee of the Federal University of Ceara / Department of Clinical Medicine approved this clinical-laboratory study under protocol No 94432, and the written informed consent was obtained from all patients.

### *Histomorphometric analysis*

Specimens were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm, stained with hematoxylin-eosin and mounted on glass slides for histopathological analysis.

OEDs specimens were classified using a binary low/high system of grading dysplasia for predicting malignant transformation (Warnakulasuriya *et al*, 2008). OSCCs specimens were categorized according to the WHO classification (Barnes *et al*, 2005).

The results of this classification were as follows: 10 were low risk of OEDs, 10 were high risk of OEDs, and 11 were well differentiated OSCCs and 9 were moderately differentiated OSCCs.

### *Immunohistochemical Reaction*

For immunohistochemistry, 3-mm-thick sections were cut from paraffin-embedded material. All tissue samples were processed using standard methods, and serial sections were used for IHC. After deparaffinization and rehydration, slides were subjected to heat-induced epitope retrieval in 10 mmol/L citrate/trilogy buffer (pH=6.0) in a Pascall water bath (DakoCytomation). Endogenous peroxidase activity was blocked for 30 minutes with 0.3% hydrogen peroxide followed by 1% protein blocking for 10 minutes. The sections were incubated with primary antibodies describe in Table 3.1.1 (clone, manufacturer, dilution, antigen retrieval, and incubation). The samples were then incubated with the secondary antibody LSAB Kit (DAKO®, Carpentaria, CA, USA) for 10 minutes at room temperature. Next, development was performed using a chromogen solution prepared with DAB (3-3'-diaminobenzidine), for 10 minutes in a dark chamber (DAKO®, Carpentaria, CA, USA) and Harris hematoxylin was used for counterstaining.

Finally, coverslips were placed on the samples on glass slides, which were examined under a Leica DM 2000 optical microscope. A positive control was included in each reaction along with the samples. A negative control lacking primary antibody was performed in parallel with incubation of the experimental samples.

#### *Evaluation of IHC Staining*

The presence of brown color was used as the parameters for positive antigen labeling in all samples. Fields that were the highest signal (hot spots) were selected for imaging. Five fields were selected (adapted from Kruse-Losler *et al*, 2005), visualized and captured at 400x magnification with a Leica DFC295 HD digital camera using Las software at maximum resolution. Measurement of protein levels through conventional immunohistochemistry often cannot provide accurate results because the pathologist tends to group the immunoblots only as positive or negative. Furthermore, the use of cutoffs often impairs immunohistochemical analysis because values close to the cutoffs are still classified as “high” and “low” protein expressions (Yu *et al*, 2007). Thus, this study sought to not use scores in the analysis pattern.

Quantitative analysis of protein expression was performed by counting the number, in absolute values, of immunostained cells according to a methodology adapted from Vasconcelos *et al* (2015) and using Image J software (Image and Processing Analysis in Java – Rasband, W.S., ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Two authors carried out the analysis at separate times while unaware of the clinical data, and any disagreement was resolved by discussion.

Qualitative analysis corresponded to the intensity of immunostaining, which was based on cells displaying no, weak, moderate or strong staining (Figure 3.1.1) at the appropriate locations (nucleus, perinucleus, cytoplasm or nuclear membrane) for each antibody according to methods adapted from previous studies (Mourão *et al*, 2016; Choi *et al*, 2005).

Qualitative and quantitative analyzes were performed simultaneously on each field. Analysis consisted of counting the number of positive cells in each field and quantifying the intensity of immunoblots of specific cellular locations for each antibody as previously described. The levels of each protein within cells were normalized and then assessed using statistical analysis as follows.

### *Statistical analysis*

Results of the above analyses were used to construct a database in an Excel spreadsheet. Then, this data was transferred to SPSS 17.0 running on a Windows system. The Kolmogorov–Smirnov normality testing was performed, and we utilized analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-test for comparisons between groups. The data were expressed as the mean and standard error of the mean (Mean±s.e.m.) based on a 5% level of significance ( $p < 0.05$ ).

Previous data (Fillies *et al*, 2005; Ayala *et al*, 2010; Eckert *et al*, 2011) were also used in order to meet the appropriate requirements for statistical analysis, and the sample size was calculated. The sample was been designed to provide a power of 80% and a confidence level of 95% to detect a significant differences in immunohistochemical results between the groups of patients with oral lesions. Additionally, the sample was designed to sustain a 20% loss, resulting in a final sample estimated to include 20 patients.

## **Results**

### *p-JNK*

Immunohistochemical analysis of p-JNK revealed nuclear and cytoplasmic immunostaining in both normal and dysplasic epidermoid cells of all evaluated specimens (Figure 3.1.1).

The average number of cells with strong nuclear immunostaining was higher in controls compared to OED and OSCC samples ( $p < 0.001$ ). Conversely, the highest average number of cells with weak nuclear immunostaining was observed in OSCC samples ( $p < 0.001$ ). There was no difference between the average intensity of cytoplasmic immunostaining (Table 3.1.2), nor

was a difference in nuclear staining observed between the different gradations of OED (Table 3.1.3).

There was no difference in nuclear and cytoplasmic p-JNK staining between the different sets of OSCC. Nevertheless, nuclear staining was highest in the OSCC groups, followed by OED and then the control group ( $p < 0.001$ ). These results indicate an inverse association between the level of p-JNK in the nucleus and the degree of tissue dysplasia (Table 3.1.3).

### *FoxO3a*

Immunohistochemical analysis of FoxO3a revealed nuclear and cytoplasmic signal in both normal and dysplastic cells of all evaluated specimens (Figure 3.1.1).

A higher average number of cells with nuclear immunostaining was found in NOE compared to OED and OSCC ( $p < 0.001$ ). Most of this signal was strong ( $p < 0.001$ ) and moderate ( $p < 0.001$ ) (Table 3.1.2). We also observed a difference in nuclear signal between different gradations of OED ( $p = 0.010$ ), with greater numbers of cells showing weak cytoplasmic signal in low risk OED ( $p = 0.029$ ) (Table 3.1.3).

As seen in Table 3.1.4, we observed a difference in cytoplasmic immunostaining between high and low risk OSCC and OED ( $p = 0.040$ ), with a higher level of staining in OSCC. This difference is better evidenced in cells displaying weak cytoplasm immunostaining, where a higher average number was observed in OSCC compared to NOE and HRD ( $p = 0,001$ ), and in cells with moderate cytoplasm immunostaining, where a higher average number was observed in OSCC compared to low risk OED ( $p = 0.019$ ).

### *p-AKT*

Immunohistochemical analysis of p-AKT revealed nuclear, perinuclear and cytoplasmic immunostaining in the dysplastic epidermoid cells of all evaluated specimens. Membrane staining was not observed in NOE (Figure 3.1.1).

We observed increased nuclear staining in OSCC compared to NOE and OED ( $p = 0.002$ ). A similar pattern was found for weak cytoplasmic immunostaining, where more OSCC cells displayed low cytoplasmic signal relative to the other groups ( $p < 0.001$ ). OED samples displayed greater numbers of cells with strong and moderate cytoplasmic immunostaining relative to OSCC samples ( $p=0.022$  and  $0.002$ , respectively). Regarding membrane marking, immunostaining was higher in OSCC compared to OED and NOE ( $p < 0.001$ ) (Table 3.1.2).

There was a difference in strong and moderate membrane labeling between the gradations of OED ( $p = 0.022$  and  $0.002$ , respectively) (Table 3.1.3).

As shown in Table 3.1.4, we observed greater perinuclear signal in low risk OED compared to OSCC ( $p = 0.029$ ). We also observed membrane signal that increased with the degree of malignant differentiation ( $p < 0.001$ ), and correlated inversely to weak cytoplasmic signal ( $p < 0.001$ ). Interestingly, there was a greater level of moderate membrane staining in high risk OED samples compared to low risk OED and control samples ( $0 \pm 0$ ) ( $p < 0.001$ ). Finally, greater levels of strong membrane signal in OSCC samples relative to controls was observed ( $p = 0.008$ ).

### KI-67

Analysis of Ki-67 revealed exclusive nuclear (nucleoplasm and nucleolus) immunostaining in both normal and dysplastic epidermoid cells of all evaluated specimens, with greater signal in the basal and parabasal layers of control samples (Figure 3.1.1).

The mean number of cells displaying nuclear Ki-67 was directly linked to the grade of cell differentiation ( $p < 0.001$ ), regardless of whether the signal was strong, moderate, or low staining ( $p < 0.001$ ) (Table 3.1.2). There was no difference in nuclear staining between the gradations of OED and OSCC (Table 3.1.3). The average number of cells positive for Ki-67 was increased most significantly in the OSCC groups, followed by HRD, LRD and control groups ( $p < 0.001$ ). This association was further confirmed by stronger nuclear staining in OSCC compared with low-risk and control OED ( $p = 0.001$ ). Moderate staining was greater in OSCC compared to OED and controls ( $p < 0.001$ ). Finally, mild staining was greater in OSCC and HRD compared to the controls ( $p < 0.001$ ) (Table 3.1.4).

### Correlations

To determine the possible interactions between the molecules studied and to better understand their functions and mechanisms of action in the OEDs and OSCCs, we built a diagram that shows a covariance structure model of the antitumor antibodies FoxO3a and p-JNK, as well as KI-67 activation influenced by AKT in the cases of OSCC (Figure 3.1.2) and OED samples (Figure 3.1.3) of this research. The analyzed data were then further assessed using Pearson Correlation Test.

## Discussion

This immunohistochemical study was designed to understand and relate the carcinogenesis of OED and OSCC through the PI3K/AKT signaling pathway, which has been extensively investigated in the tumorigenesis process of multiple types of cancers, including OSCCs. However, few studies have approached the association of potentially malignant oral lesions with deregulation of this pathway.

### p-JNK

In the samples we examined, specimens with dysplasia showed similar behavior to OSCC cases, with loss of nuclear p-JNK (Table 3.1.2). Nuclear p-JNK localization appears to be lost in the malignant lesion, as there were more cells with strong nuclear immunostaining in low-grade dysplasia compared to high grade (Table 3.1.3). These findings lead us to assume that the lower nuclear levels of p-JNK in these samples are related to the regulation of tumorigenesis. Similar research using human gastric cancer specimens found greater nuclear staining of p-JNK during early clinical stages of the tumor, in patients with higher survival rates, and correlated inversely with lymphatic invasion (Choi *et al*, 2016). Despite these findings suggesting a protective role of p-JNK, Choi *et al* (2016) found, through cell culture experiments, that the inhibition of p-JNK reduced the expression of D1 cyclin proteins and limited colony formation. This indicated that the activation of p-JNK (Nuclear JNK) is at least partially required for cell growth and proliferation in the early stages of cancer. However, we must consider that p-JNK does not have a single target, such as cyclins, but a large number of downstream substrates that are mostly nuclear transcription factors, cytoplasmic proteins and the mitochondrial membrane proteins (Wang *et al*, 2012). The tumor suppressor activity of JNK is closet related to its apoptotic function through a mitochondrial pathway (Davis, 2000), which can occur when p-JNK targets p53 by promoting its phosphorylation and subsequent accumulation and activation as a transcriptional regulator (Oleinik *et al*, 2007).

In this study, we did not observe differences in the p-JNK expression patterns in HRD and OSCC (Table 3.1.4), which led us to believe that malignant transformation of dysplasias may involve the same mechanisms of established malignant lesions. One possible explanation of this finding is that the cell has a fail-safe mechanism, which requires coordinated activity between JNK and P53 (Gowda *et al*, 2012). As P53 is often lost in OSCC and OEDs, the apoptosis may therefore not be induced by p-JNK, contributing to the oncogenic cellular transformation. This study did not conduct experiments with P53, which limited us to draw only theories to explain ours results and not make greater conjectures. Further research seeking to



analyze the crosstalk between P53 and p-JNK in the carcinogenesis process are therefore necessary.

Findings from previous work have demonstrated aberrant expression of JNK in many cancer cell lines, as well as in biopsy samples from cancer patients (Hui *et al*, 2008; Chang *et al*, 2009; Barbarulo *et al*, 2013). This suggests that JNK may contribute to the cellular transformation required for carcinogenesis (Bubici and Papa, 2014), as the individual depletion of various subtypes of JNKs can suppress tumor activity depending on the specificity of the tissue (Wagner and Nebreda, 2009). The pro-tumorigenic role of JNK in many types of cancer has led to increasing investigation into possible therapeutic avenues using this protein. However, inhibition of JNK can also be harmful (Bubici and Papa, 2014), as substantial evidence has implicated JNK as a tumor suppressor (Davis, 2000; Wagner and Nebreda, 2009). Thus, it is necessary to understand the molecular basis of the dual role of JNK in different tumors in order to validate the actual therapeutic potential of inhibiting it (Bubici and Papa, 2014). One possible explanation for the opposing pro- and anti-tumorigenic roles of JNK is the regulation of many specific cellular targets in different cancer types, although many of these target proteins remain still unknown (Bubici and Papa, 2014). Other variables that affect the level of complexity of JNK regulation in tumorigenesis include the stimulus for activation, duration of activation and the context of its production (Du *et al*, 2004).

### FoxO3a

Here, we observed that the advance of malignance in dysplasias was accompanied by the gradual loss of nuclear FoxO3a immunostaining (Table 3.1.3), leading to similar qualitative immunostaining results as those observed in HRD and OSCCs (Table 3.1.4). The antitumor role of FoxO3a in OSCC has been previously demonstrated (Fang *et al*, 2011a, Fang *et al* 2011b, Chi *et al*, 2015). Its nuclear localization is associated with decreased cell proliferation and increased apoptosis of tumor cells *in vitro*, as well decreased tumor size *in vivo* (Fang *et al*, 2011b). Together with the results of the current work, these results suggest that the loss of nuclear FoxO3a is involved not only in established malignant lesions but also in the malignant transformation of oral dysplasia. To our knowledge, this is the first study that evaluates FoxO3a in the context of oral dysplasias.

However, recent research has shown an unexpected pro-tumorigenic role of FoxO, suggesting more complex activity of this protein in tumors (Hui *et al*, 2008, Tenbaum *et al*, 2012, Osuka *et al*, 2013, Yu *et al*, 2016). Here, through the analysis of FoxO3a expression *in situ*, we found no evidence of a possible pro-tumorigenic role of this protein in the samples

examined. Previous work has demonstrated that in the early stages of a tumor, inactivating FoxO3a provides a proliferative advantage to neoplastic cells by increasing signaling through growth factor. In contrast, the later stages of tumor stress conditions, such as serum deprivation, hypoxia and oxidative stress, can reactivate FoxO3a and thus increase the survival of tumor cells (Li *et al*, 2012; Yu *et al*, 2016). These data underpin the findings of the present study, allowing us to propose that the inactivation of FoxO3a in dysplasias (i.e., early-stage malignant lesions), contributes in some way to their malignant progression. Furthermore, the inactivation of FoxO3a provides a proliferative advantage to OSCCs investigated in this study. Our samples were in the early stages of malignancy, as the sample was composed only of well differentiated and moderately differentiated tumours, with no poorly differentiated cases. Thus, the role of FoxO3a in tumorigenesis is context-dependent (Li *et al*, 2012), as its activity is controlled differently in specific tissues in response to various external stimuli and intensities (Calnan and Brunet, 2008).

We observed a significant increase in weak cytoplasmic immunostaining in the OSCCs group relative to the HRD group (Table 3.1.4). This may be due to a certain degree of protein degradation because FoxO can be ubiquitinated and degraded by cytoplasmic proteasomes (Van der Heide *et al*, 2004). In this study, cytoplasmic immunostaining of FoxO3a near the membrane was observed both in the control group and in the dysplasias and OSCC samples; however, this parameter was not measured.

### *p-AKT*

The activity of Akt is modulated downstream of PI3K, and then the protein is recruited to the sites of plasma membrane and phosphorylated at two sites by PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) (at Thr308, AKT1 residue) and mTORC2 (mammalian target of rapamycin) (Ser473, residue AKT1) (Nicholson and Anders, 2002; Dillon and Muller, 2010). This leads to AKT activation, where phosphorylated AKT dissociates from the plasma membrane and phosphorylates its targets in the cytoplasm and nucleus (Dillon and Muller, 2010). The phosphorylation of these AKT targets is required for oncogenic transformation (Mende *et al*, 2001). However, the selection of the substrate can be affected by AKT localization within the cell location (Dufner *et al*, 1999), so it is therefore important to know the subcellular localization of this protein (Nicholson and Anders, 2002). Our current study assessed the immunostaining of p-AKT at the membrane, cytoplasm, nucleus and perinuclear regions. To our knowledge, this is the first study to evaluate activated AKT in the context of all levels of cellular location.

AKT1 does not efficiently transform cells in culture unless it is bound to the plasma membrane (Mirza *et al*, 2000; Sun *et al*, 2001). Thus, pathological association of AKT with the plasma membrane is a common thread that connects AKT with cancer (Carpten *et al*, 2007). Here, we observed that the presence of p-AKT at the membrane was proportional to the degree of malignancy of the dysplasia (Table 3.1.3). This results gives us reason to believe that the malignant transformation process of oral lesions and oral cancer involves the AKT1 activation, and that activation of this protein is essential in the early stages of malignant transformation of oral lesions.

Interestingly, when analysing the intensity of immunostaining, we observed that the OSCC samples had a pattern of weak membrane immunostaining that was significantly higher than that seen in HRD and LRD. We also observed light cytoplasmic immunostaining that was significantly higher in OSCC than in HRD and the controls (Table 3.1.4). This result could be due to AKT nuclear translocation, as this is part of its activation process (Noguchi *et al*, 2014) and leads to reduction of Akt levels at the plasma membrane and in the cytoplasm (Dillon and Muller, 2010). In addition, the most sensitive mechanism to reduce AKT activity is autophagy (Degtyarev *et al*, 2008). This finding leads us to suggest that the lower expression of AKT at the membrane and in the cytoplasmic found in this study might also be related to the induction of autophagy.

Autophagy has been implicated both in tumor suppression (Takamura *et al*, 2011; White *et al*, 2012) as well as in promoting tumor growth (White *et al*, 2012). The activation of AKT in the plasmatic membrane analysed inhibits the autophagy induction and the AKT at the plasma membrane inhibits induction of autophagy, and translocation of AKT from the cytosol to lysosomes induces autophagy (Noguchi *et al*, 2014; Matsuda-Lennikov *et al*, 2014). AKT1 and AKT2, but not AKT3, interact with the lysosomal protein Phafin2 (also known as EAPF or PLEKHF2). Furthermore, AKT-Phafin2 translocation to the perinuclear lysosomes has been implicated in autophagy (Noguchi *et al*, 2014; Matsuda-Lennikov *et al*, 2014). The perinuclear immunostaining of p-Akt in this study was found to be significantly higher in the LRD samples than in OSCCs (Table 3.1.4). It was also significantly higher in LRD when compared to HRD (Table 3.1.3), suggesting the involvement of autophagolysosomes in inhibiting the PI3K-AKT pathway in the early stages of progression of malignancy. The lower cytoplasmic and membrane levels of p-AKT we found in OSCC may contribute to autophagy; however, no statistically significant in these levels were observed when compared to the control group (Table 3.1.4). This may be explained because in the present study, despite presenting data related to the pathological staging of OSCC, the choice of these cases may have been biased

towards selection of lesions in early clinical stages, as we had limited access to the clinical assessments of the cases studied. Moreover, contrary to the methodology of Massarelli *et al* (2005), case controls in our current study did not exclude smoking and/or alcohol consumption. This may have influenced the immunohistochemical results, as previous cell culture experiments have shown that AKT activation occurs within a few minutes of when cells are exposed to cigarette substances in concentrations similar to those occurring in the individual smoker (West *et al*, 2002).

### Ki-67

Immunostaining with Ki-67 antibodies is well established as a quick and efficient method to evaluate the antiproliferative profile of neoplasias, as the protein binds to cells undergoing proliferation (Birajdar *et al*, 2014). In this study, Ki-67 immunohistochemical analysis revealed the protein exclusively in the nuclei of OSCC and OED cells, while in controls it was observed more commonly at the basal and parabasal layers. These findings corroborate the studies of Kobayashi *et al* (2010) and Hasegawa *et al* (2016), who suggested this protein as an important marker in the histopathologic scope of premalignant epithelial lesions. The presence of nuclear Ki-67 was significantly increased in OSCC compared to OED and the control (Table 3.1.2). It was also greater in OED samples compared to the control, revealing a direct relationship between KI-67 immunoreactivity and the grade of malignant cell differentiation and proliferation (Birajdar *et al*, 2014; Hasegawa *et al*, 2016).

Birajdar *et al* (2014) reported that immunostaining for Ki-67 increases with proliferative cellular activity and OED degree, suggesting this protein as an important marker of for proliferation and for sorting / grading in the OED based on greater expression in the suprabasal layers. In this study, we noted the same trend in the samples; however, Ki-67 expression did not differ between HRD and LRD (Table 3.1.3), regardless of the localization pattern. These findings lead us to believe that the lower level of Ki-67 seen in OED can be related to the state of proliferation and differentiation of OED. Kujan *et al* (2006) analysed immunostaining of Ki-67 in HRD and LRD. The authors found lower levels in the basal, stratum spinosum and parabasal cell layers in LRD samples, while in the number of proliferating cells with positive staining for Ki-67 was higher in HDR, consistent with the degree of dysplasia.

This increased proliferation in parabasal layers of OED is probably related to loss of heterozygosity in 3p, 9p, and 17p, which serve a markers of differentiation, and increases the risk of neoplasias (Tabor *et al*, 2003; Birajdar *et al*, 2014).

As seen in Figure 3.1.2, we observed that the presence of cytoplasmic AKT in OSCC was moderately but directly correlated with its membrane form. These findings are in agreement with the literature, as AKT activation begins at the membrane and carries out its various functions upon reaching the cytoplasm where it targets diverse substrates (Nicholson and Anderson, 2002; Gonzalez and McGraw, 2009; Dillon and Muller, 2010). Interestingly, we did not observe this association in OED samples (Figure 3.1.2), which leads us to suggest that the activation of AKT in these injuries could happen through a mechanism that does not involve the classic mode of AKT activation; that is, through its prior activation at the membrane. Recent studies have demonstrated that other kinases can interact with AKT and induce cellular transformation without requiring the PI3K signaling pathway (Mahajan *et al*, 2010; Joung *et al*, 2011; Xie *et al*, 2011; Guo *et al*, 2011; Mahajan and Mahajan 2012). Ser / Thr kinase I- $\kappa$ -B kinase epsilon (I $\kappa$ B $\epsilon$ ) has the ability to activate AKT regardless of the PH domain and without requiring PI3K, mTORC2, or PDK1 (Xie *et al*, 2011; Guo *et al*, 2011). The non-receptor tyrosine kinase Ack I (activated CDC42-associated kinase 1) is able to recruit and activate AKT by inducing the phosphorylation of Tyr176 residue without necessitating PI3K activity (Mahajan *et al*, 2010). Additionally, TBK1 (TANK-binding kinase I) interacts with and activates AKT in a PI3K-independent manner (Joung *et al*, 2011). Other kinases involved in this pathway include protein kinase 6, Src (cellular Src kinase), DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) and ATM (ataxia telangiectasia mutated protein) (Mahajan and Mahajan 2012).

As previously discussed, we found here that autophagy, denoted by the presence of perinuclear AKT (Matsuda-Lennikov *et al*, 2014; Noguchi *et al*, 2014), was primarily observed in OED (especially in LRD) rather than in the OSCC. Interestingly, Figure 3.1.2 shows that in OSCC, the cell autophagy process is directly related to increased cell proliferation, represented by immunostaining of KI-67. This finding leads us to suggest a different role for autophagy in OSCC compared to that observed in OED, and it emphasizes that cell autophagy is context dependent (White *et al*, 2012). Similar research has found a direct association between markers related to autophagy and Ki-67 in breast cancer samples (Ueno *et al*, 2016). A link between nuclear AKT and greater cell proliferation rates is expected, as AKT targets certain nuclear substrates and its nuclear localization is a requirement for activation (Noguchi *et al*, 2014). The presence of nuclear p-AKT was found during similar studies of oropharyngeal squamous cell cancer, revealing a significant inverse correlation with the immunoexpression of nuclear PTEN (Yu *et al*, 2007).

Nuclear AKT immunostaining provided a strong and direct correlation with cytoplasmic JNK (Figure 3.1.2). A direct connection between JNK and the AKT pathway has not been found

(Kim *et al*, 2001). However, the association between JNK and AKT appears to involve cross-talk with FoxO3a, as previously discussed. Furthermore, increased AKT activity may lead to suppression of the apoptotic activity of JNK (Kim *et al*, 2001; Fey *et al*, 2012), allowing its activity to be only proliferative (Fey *et al*, 2012). Kim *et al* (2001) found that Akt suppresses apoptotic activity of JNK through phosphorylation and subsequent inactivation of ASK1 (signal-regulating kinase 1), which is responsible for activating MKK4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4) and MKK7 (mitogen-activated protein kinase kinase 7). The latter proteins are directly involved in activation of JNK. As previously discussed, we assume that in the tumor context of OSCC used here, nuclear AKT may be heavily involved in the relocation of JNK to the cytoplasm, thereby preventing it from acting on nuclear transcription factors that may have tumor suppressor role.

As show Figure 3.1.3, we observed in OEDs a weak inverse correlation between the presence of membrane and nuclear AKT. As previously discussed, the nuclear translocation of AKT reduces its levels at the membrane and in the cytoplasm, affecting the phosphorylation of substrates in these cellular compartments (Dillon and Muller, 2010). Nuclear translocation also increases its influence on specific nuclear targets, generating, among other things, progression of the cell cycle and suppression of apoptosis (Martelli *et al*, 2012). Despite not knowing exactly how AKT enters the nucleus (Martelli *et al*, 2012), it is important to note here is we identified its nuclear localization in OEDs and in OSCCs, with statistically significant differences between the two (Table 3.1.2). The presence of nuclear AKT is found in several types of cancer, such as lung (Lee *et al*, 2002), breast (Nicholson *et al*, 2003), thyroid (Vasko *et al*, 2004), prostate (Van de Sande *et al*, 2005) and invasive cellular carcinomas of the head and neck (Giudice *et al*, 2011). Here, we also found nuclear AKT in premalignant lesions in this study, which leads us to suggest that AKT in the nucleus is involved in the process of malignant transformation cell.

Cytoplasmic localization of JNK had a moderate inverse correlation with perinuclear localization of AKT (Figure 3.1.3). As previously noted, although a direct connection between AKT and JNK has not yet been found (Kim *et al*, 2001), we can suggest based on this finding that the process of cellular autophagy, indicated by the presence of AKT perinuclear (Matsuda-Lennikov *et al*, 2014; Noguchi *et al*, 2014), is connected with the reduction of cytoplasmic JNK. Zhou *et al* (2015) previously warned about the need to investigate the crosstalk between the JNK pathway and other autophagic signaling pathways. Additional research has found that cytoplasmic and nuclear JNK are involved in cell autophagy (Mehrpour *et al*, 2010). However,

according to Zhou *et al* (2015), the JNK signalling pathway is extremely complicated and little is known about its role in autophagy.

Membrane localization of AKT was moderately inversely correlated with the presence of nuclear FoxO3a (Figure 3.1.3). These results are consistent with those reported in the literature, as the phosphorylation and subsequent activation of AKT results in the sequestration of FoxO away from the nucleus in the cytoplasm (Van der Heide *et al*, 2004). Thus, as seen in the present work, the loss of nuclear FoxO3a and with its subsequent relocation to the cytoplasm shows a process involved in the malignant transformation of the OED.

In conclusion, we emphasize that this study has limitations because it is based solely on immunohistochemistry, and this technique can only assess protein expression and not the mRNA. However, using this method, we conclude that the malignant transformation process of the OED investigated here may involve the same mechanisms as established malignant lesions. Furthermore, the cellular localization of the proteins investigated has a direct role in their functions within the tumor microenvironment. This is especially true for the antitumorigenic activity of p-JNK and FoxO3a in both OEDs and OSCCs. Lastly, we found autophagy to be dependent on the context, based on a direct correlation between autophagy and cell proliferation only in cases of OSCC. This allowed us to conclude that, in these cases, autophagy has a pro-tumorigenic role.

### **Acknowledgment**

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. The authors would like to acknowledge Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, Brazil.

### **References**

- Ayala FR, Rocha RM, Carvalho KC, Carvalho AL, da Cunha IW, Lourenco SV, et al (2010). GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Molecules* **15**: 2374-87.
- Barbarulo A, Iansante V, Chaidos A, Naresh K, Rahemtulla A, Franzoso G, Karadimitris A, Haskard DO, Papa S, Bubici C (2013). Poly(ADP-ribose) polymerase family member 14 (PARP14) is a novel effector of the JNK2-dependent pro-survival signal in multiple myeloma. *Oncogene* **32**:4231-42.
- Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D (2005). World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC, Lyon. pp 209–253.

- Birajdar SS, Radhika MB, Paremala K, Sudhakara M, Soumya M, Gadivan M (2014). Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* **18**: 169-176.
- Bubici C, Papa S (2014). JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *British journal of pharmacology* **171**: 24-37.
- Calnan DR, Brunet A (2008). The FoxO code. *Oncogene* **27**: 2276-88.
- Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**: 439-44.
- Chang CJ, Mulholland DJ, Valamehr B, Mosessian S, Sellers WR, Wu H (2008). PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. *Molecular and cellular biology* **28**: 3281-9.
- Chang Q, Zhang Y, Beezhold KJ, Bhatia D, Zhao H, Chen J, et al (2009). Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer. *Journal of hepatology* **50**: 323-33.
- Chang Y, Wu XY (2009). The role of c-Jun N-terminal kinases 1/2 in transforming growth factor beta(1)-induced expression of connective tissue growth factor and scar formation in the cornea. *The Journal of international medical research* **37**: 727-36.
- Choi BY, Choi HS, Ko K, Cho YY, Zhu F, Kang BS, Ermakova SP, Ma WY, Bode AM, Dong Z. (2005). The tumor suppressor p16(INK4a) prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. *Nature structural & molecular biology* **12**: 699-707.
- Choi Y, Park J, Choi Y, Ko YS, Yu DA, Kim Y, Pyo JS, Jang BG, Kim MA, Kim WH, Lee B. (2016). c-Jun N-terminal kinase activation has a prognostic implication and is negatively associated with FOXO1 activation in gastric cancer. *BMC gastroenterology* **16**: 59.
- Davis RJ (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239-52.
- Degtyarev M, De Maziere A, Orr C, Lin J, Lee BB, Tien JY, Prior WW, van Dijk S, Wu H, Gray DC, Davis DP, Stern HM, Murray LJ, Hoeflich KP, Klumperman J, Friedman LS, Lin K (2008). Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *The Journal of cell biology* **183**: 101-16.
- Dillon RL, Muller WJ (2010). Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer research* **70**: 4260-4.
- Du L, Lyle CS, Obey TB, Gaarde WA, Muir JA, Bennett BL, Chambers TC (2004). Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity: evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. *The Journal of biological chemistry* **279**: 11957-66.



Dufner A, Andjelkovic M, Burgering BM, Hemmings BA, Thomas G (1999). Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **19**: 4525-34.

Eckert AW, Lautner MH, Schutze A, Taubert H, Schubert J, Bilkenroth U (2011). Coexpression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopathology* **58**: 1136-47.

Fey D, Croucher DR, Kolch W, Kholodenko BN (2012). Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Front Physiol* **3**: 355.

Fillies T, Werkmeister R, van Diest PJ, Brandt B, Joos U, Buerger H (2005). HIF1- $\alpha$  overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC cancer* **5**: 84.

Giudice FS, Dal Vecchio AMD, Abrahao AC, Sperandio FF, Pinto DD (2011) Different expression patterns of pAkt, NF- $\kappa$ B and cyclin D1 proteins during the invasion process of head and neck squamous cell carcinoma: an in vitro approach. *J Oral Pathol Med* **40**: 405–411.

Gowda PS, Zhou F, Chadwell LV, McEwen DG (2012). p53 binding prevents phosphatase-mediated inactivation of diphosphorylated c-Jun N-terminal kinase. *The Journal of biological chemistry* **287**: 17554-67.

Guo JP, Coppola D, Cheng JQ (2011). IKBKE protein activates Akt independent of phosphatidylinositol 3-kinase/PDK1/mTORC2 and the pleckstrin homology domain to sustain malignant transformation. *J Biol Chem* **286**: 37389–37398.

Hasegawaa M, Cheng J, Maruyama S, Yamazaki M, Abéa T, Babkair H, Saito C, Saku T (2016). Differential immunohistochemical expression profiles of perlecan-binding growth factors in epithelial dysplasia, carcinoma in situ, and squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *Research and Practice* **212**: 426–436.

Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner EF (2008). Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *The Journal of clinical investigation* **118**: 3943-53.

Joung SM, Park ZY, Rani S, Takeuchi O, Akira S, Lee JY (2011). Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1. *J Immunol* **186**: 499–507.

Kim DK, Cho ES, Seong JK, Um HD (2001). Adaptive concentrations of hydrogen peroxide suppress cell death by blocking the activation of SAPK/JNK pathway. *J Cell Sci* **114**: 4329-34.

Kobayashi T, Maruyama S, Cheng J, Ida-Yonemochi H, Yagi M, Takagi R, Saku T (2010). Histopathological varieties of oral carcinoma in situ: diagnosis aided by immunohistochemistry dealing with the second basal cell layer as the proliferating center of oral mucosal epithelia, *Pathol Int* **60**: 156–166.

- Kruse-Lösler B, Flören C, Stratmann U, Joos U, Meyer U (2005). Histologic, histomorphometric and immunohistologic changes of the gingival tissues immediately following mandibular osteodistraction. *J Clin Periodontol* **32**: 98-103.
- Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Solan P (2006). Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* **42**: 987-93.
- Lam EW, Francis RE, Petkovic M (2006). FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochemical Society Transactions* **34**: 722-6.
- Lee SH, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee KY, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ (2002). Non-small cell lung cancers frequently express phosphorylated Akt; an immunohistochemical study. *APMIS* **110**: 587-592.
- Li Z, Zhang H, Chen Y, Fan L, Fang J (2012). Forkhead transcription factor FOXO3a protein activates nuclear factor kappaB through B-cell lymphoma/leukemia 10 (BCL10) protein and promotes tumor cell survival in serum deprivation. *The Journal of biological chemistry* **287**: 17737-45.
- Liu W, Shi LJ, Wu L, Feng JQ, Yang X, Li J, Zhou ZT, Zhang CP (2012). Oral cancer development in patients with leukoplakia--clinicopathological factors affecting outcome. *PloS one* **7**: e34773.
- Mahajan K, Coppola D, Challa S, Fang B, Chen YA, Zhu W, Lopez AS, Koomen J, Engelman RW, Rivera C, Muraoka-Cook RS, Cheng JQ, Schönbrunn E, Sebt SM, Earp HS, Mahajan NP (2010). Ack1 mediated AKT/PKB tyrosine 176 phosphorylation regulates its activation. *PLoS ONE* **5**: e9646.
- Mahajan K, Mahajan NP (2012). PI3K-independent AKT activation in cancers: A treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol* **227**: 3178-3184.
- Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, Evangelisti C (2012). The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 2168-78.
- Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Lo Muzio L, Staibano S, De Placido S, Myers JN, Papadimitrakopoulou VA. (2005). Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer* **104**: 2430-6.
- Matsuda-Lennikov M, Suizu F, Hirata N, Hashimoto M, Kimura K, Nagamine T, Fujioka Y, Ohba Y, Iwanaga T, Noguchi M (2014). Lysosomal interaction of Akt with Phafin2: a critical step in the induction of autophagy. *PloS one* **9**: e79795.
- Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res* **20**: 748-62.
- Mende I, Malstrom S, Tsihchlis PN, Vogt PK, Aoki M (2001). Oncogenic transformation induced by membrane-targeted Akt2 and Akt3. *Oncogene* **20**: 4419-23.

- Mirza AM, Kohn AD, Roth RA, McMahon M (2000). Oncogenic transformation of cells by a conditionally active form of the protein kinase Akt/PKB. *Cell Growth Differ* **11**: 279–292.
- Mourao RV, Junior EC, Barros Silva PG (2016). Study of the relationship between mononuclear inflammatory infiltrate and Ki-67 and basement membrane and extracellular matrix protein expression in radicular cysts. *49*: 447-53.
- Nicholson KM, Anderson NG (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signalling* **14**: 381-95.
- Nicholson KM, Streuli CH, Anderson NG (2003). Autocrine signalling through erbB receptors promotes constitutive activation of protein kinase B/Akt in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* **81**: 117–128.
- Noguchi M, Hirata N, Suizu F (2014). The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy. *Biochimica et biophysica acta*. **1846**: 342-52.
- Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA (2007). Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway. *Oncogene* **26**: 7222-30.
- Osuka S, Sampetean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E, Okubo J, Fujita S, Takano S, Matsumura A, Saya H. (2013). IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem cells* **31**: 627-40.
- Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tschlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ (2001). AKT1/PKBA kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* **159**: 431–437.
- Tabor MP, Braakhuis BJ, van der Wal JE, van Diest PJ, Leemans CR, Brakenhoff RH, et al (2003). Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oro pharynx. *J Pathol* **199**:354-60.
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & development* **25**: 795-800.
- Tenbaum SP, Ordonez-Moran P, Puig I, Chicote I, Arques O, Landolfi S, Fernández Y, Herance JR, Gispert JD, Mendizabal L, Aguilar S, Ramón y Cajal S, Schwartz S Jr, Vivancos A, Espín E, Rojas S, Baselga J, Tabernero J, Muñoz A, Palmer HG (2012). Beta-catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nature medicine* **18**: 892-901.
- Ueno NT, Mamounas EP (2016). Neoadjuvant nab-paclitaxel in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **156**:427-40.
- Van de Sande T, Roskams T, Lerut E, Joniau S, Van Poppel H, Verhoeven G, Swinnen JV (2005). High-level expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB. *J Pathol* **206**: 214–219.

Van der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *The Biochemical journal* **380**: 297-309.

Vasconcelos MG, Vasconcelos RG, Oliveira DHIP, Santos EM, Silveira EJD, Queiroz LMG (2015). Distribution of Hypoxia-Inducible Factor-1a and Glucose Transporter-1 in Human Tongue Cancers. *J Oral Maxillofac Surg* **73**: 1753-1760.

Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, Miyakawa M, Isozaki O, Murakami H, Tsushima T, Burman KD, De Micco C, Ringel MD (2004). Akt activation and localization correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet* **41**: 161–170.

Vieira FL, Vieira BJ, Guimaraes MA, Aarestrup FM (2008). Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading. *BMC Oral Health* **8**: 25.

Wagner EF, Nebreda AR (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature reviews Cancer* **9**: 537-49.

Wang H, Yang YB, Shen HM, Gu J, Li T, Li XM (2012). ABT-737 induces Bim expression via JNK signaling pathway and its effect on the radiation sensitivity of HeLa cells. *PloS one* **7**: e52483.

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E (2008). Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* **37**: 127-33.

West KA, Castillo SS, Dennis PA (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy **5**: 234-48.

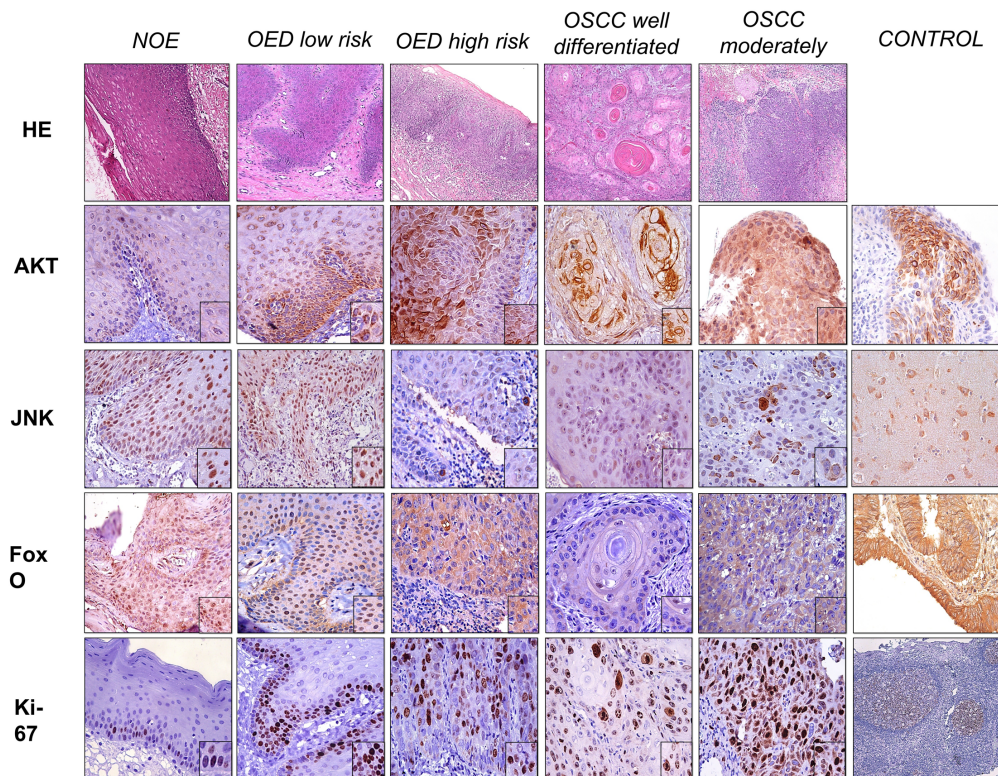
Xie X, Zhang D, Zhao B, Lu MK, You M, Condorelli G, Wang CY, Guan KL (2011). IkappaB kinase epsilon and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 6474–6479.

Yu S, Yu Y, Zhang W, Yuan W, Zhao N, Li Q, Cui Y, Wang Y, Li W, Sun Y, Liu T (2016). FOXO3a promotes gastric cancer cell migration and invasion through the induction of cathepsin L. *Oncotarget* [Epub ahead of print]

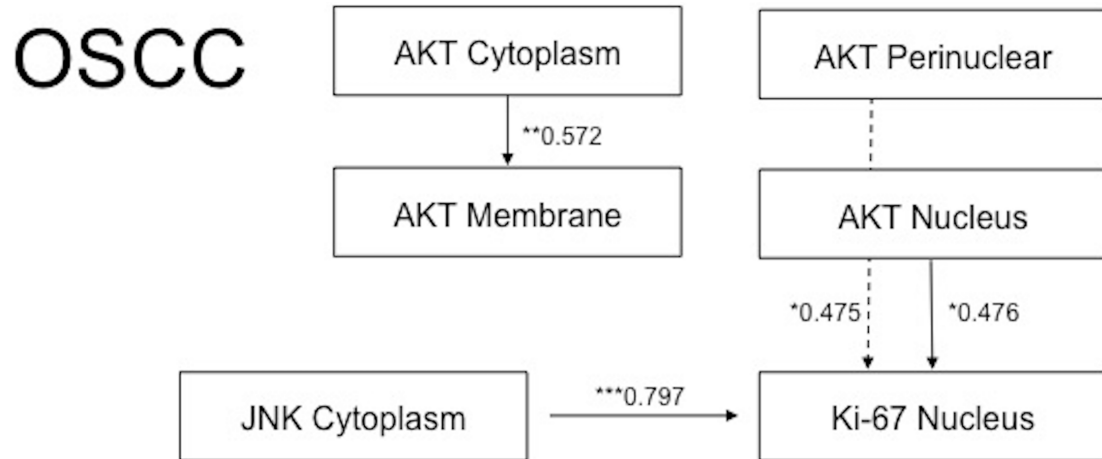
Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Egleston BL, Speier WF, Haffty B, Kowalski D, Camp R, Rimm D, Vairaktaris E, Burtness B, Psyrri A (2007). Phosphorylation of Akt (Ser473) Predicts Poor Clinical Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**: 553-558

Zhou J, Xu G, Ma S, Li F, Yuan M, Xu H, Huang K (2015). Catalpol ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and adipose tissue inflammation by suppressing the JNK and NF- $\kappa$ B pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **467**: 853-8.

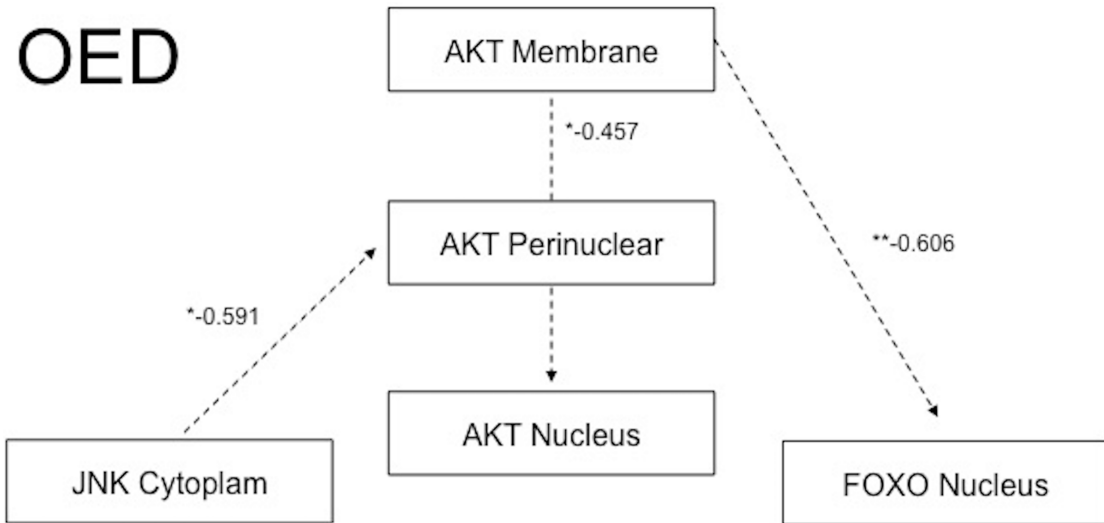
## FIGURES



**Figure 3.1.1:** P-Akt immunoreactivity was found in the membrane, cytoplasm, nucleus and perinucleus of malignant cells. In the NOE (B1), there was a weak cytoplasmic staining (arrow) and absence of immunoreactivity of p-AKT membrane (higher magnification). In OED we found a bigger and stronger cytoplasmic immunostaining as it takes the high-risk classification (higher magnification) and observed a prevalence of moderate cytoplasmic immunostaining in B2 (arrow) and a greater prevalence of strong cytoplasmic immunostaining in B3 (arrow). Immunoreactivity of P-AKT was most observed in the membrane, cytoplasm, nucleus and perinuclear region of OSCC cells (higher magnification in B4 and B5). In B4 it is shown a higher perinuclear marking (arrow) and in B5 it is observed higher nuclear staining (arrow). P-JNK immunoreactivity was found in the nucleus and cytoplasm of OSCC, OED and NOE. There was a higher strong nuclear immunostaining directly associated with the gradation control (C1) to OED (C2 and C3) and OSCC (C4 and C5), in C1 we observed a predominance of strong nuclear staining (greater magnification and arrow) while in C4 further weak nuclear immunostaining is more evident (greater magnification and arrow). nuclear P-JNK expression in OSCC appears to be lost to the malignant transformation of the lesion advances. FOXO3a immunoreactivity was found in the nucleus and cytoplasm of malignant, dysplastic and NOE cells. The loss of Nuclear expression in FOXO3a looks similar to the patterns observed in p-JNK, showing a predominance of strong nuclear staining in D1 (arrow), moderate and weak nuclear staining in D2 and D3 (greater magnification and arrow). Nuclear marking absence was more observed in OSCC (higher magnification D4 and D5). Greater cytoplasmic staining was observed in OSCC with the weak cytoplasmic labeling in D4 and and the moderate in D5 (arrow and higher magnification). The Ki-67 immunoreactivity was found in the nucleoplasm and the nucleolus of malignant cells (higher magnification and arrows and E4 and E5), and in NOE immunostaining was restricted to basal and parabasal layers epithelial layers (E1). The intensity and number of Ki-67 immunostained cells increases with progression of the malignant disease cells. (LSAB, 400x).



**Figure 3.1.2:** Path diagram depicting the covariance structure model of OSCC immunostaining profile. Rectangles represent manifest (measured) variables. Single-headed arrows represent correlations between the immunostaining patterns. Numbers adjacent to arrows are standardized path coefficients. Variables on the left are assumed to be causally prior to those on the right. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .



**Figure 3.1.3** Path diagram depicting the covariance structure model of Oral Epithelial Dysplasias immunostaining profile. Rectangles represent manifest (measured) variables. Single-headed arrows represent the correlations between the immunostaining patterns. Numbers adjacent to arrows are standardized path coefficients. Variables on the left are assumed to be causally prior to those on the right. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .



## TABLES

Table 3.1.1: Antibody specifications

Antibody	Specification	Flask / concentration	Brand	Positive Control	Dilution	Incubation Time	Antigenic Retrieval Method
<b>Anti-AKT1 (phospho S473)</b>	Rabbit mono ab - clone EP2109Y	100g	Abcam	Cervical cancer	1:100	Overnight	Trylogy ph6
<b>Anti-JNK1 + JNK2 + JNK3 (phospho T183+T183+T221)</b>	Rabbit mono ab - clone EPR5693	100g / 100 µl / 1.071 - 1.732 mg/ml	Abcam	Brain	1:100	2 hours	Citrate ph6
<b>Anti-FoxO3A</b>	Rabbit poli ab	100g / 50 µl / 1.1 - 1.12 mg/ml	Abcam	Cervical cancer	1:100 (OSCC) 1:400 (OED)	60 min	Citrate ph6
<b>Ki-67</b>	Rabbit mono ab	100 µg / 0.9 - 1 mg/ml	Abcam	Lymph node	1:300	Overnight	Citrate ph6

**Table 3.1.2:** Mean and intensity of immunostained cells in membrane, cytoplasm and nucleus of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma.

Antibody/Staining	cells			<i>p</i>
	NOE	OED	OSCC	
p-AKT - nuclear	1.8±4.7	7.9±8.1	21.2±19.0*†	<b>0.002</b>
p-AKT - perinuclear	14.3±8.1	20.2±10.0	15.1±9.5	0.181
p-AKT - strong cytoplasmic	14.9±7.6	16.1±11.0	8.2±6.8*	<b>0.022</b>
p-AKT - moderate cytoplasmic	44.8±9.5	35.8±8.4	28.2±12.3*	<b>0.002</b>
p-AKT - weak cytoplasmic	39.5±10.9	42.8±12.3	59.9±15.7*†	<b>&lt;0.001</b>
p-AKT - negative cytoplasmic	0.8±0.6	5.2±4.6*	6.1±5.5*	<b>0.032</b>
p-AKT - strong membrane	0.0±0.0	10.1±10.3	17.7±19.7*	<b>0.025</b>
p-AKT - moderate membrane	0.0±0.0	20.0±12.2*	18.9±11.9*	<b>0.001</b>
p-AKT - weak membrane	0.0±0.0	19.3±7.8*	52.6±21.7*†	<b>&lt;0.001</b>
p-AKT - negative membrane	100.0±0.0	50.6±23.7*	33.9±20.8*†	<b>&lt;0.001</b>
Ki67 - strong nuclear	1.9±2.0	11.8±10.6	48.1±49.6*†	<b>&lt;0.001</b>
Ki67 - weak nuclear	8.6±3.1	13.3±3.9*	16.3±4.8*	<b>&lt;0.001</b>
Ki67 - moderate nuclear	3.3±1.2	7.3±3.2	20.2±7.4*†	<b>&lt;0.001</b>
Ki67 – nuclear	12.3±4.1	25.8±9.1*	54.6±16.8*†	<b>&lt;0.001</b>
p-JNK - strong nuclear	48.3±13.7	11.0±10.3*	1.1±1.3*†	<b>&lt;0.001</b>
p-JNK - weak nuclear	9.9±7.6	32.5±12.0*	49.8±19.5*†	<b>&lt;0.001</b>
p-JNK - moderate nuclear	14.4±10.8	19.7±15.5	17.7±20.5	0.844
p-JNK - negative nuclear	27.5±13.0	36.9±18.4	31.4±14.3	0.421
p-JNK - strong cytoplasmic	0.1±0.3	0.4±0.4	0.9±1.0	0.090
p-JNK - weak cytoplasmic	21.5±42.0	25.0±24.5	17.4±16.5	0.587
p-JNK - moderate cytoplasmic	0.2±0.4	2.2±3.6	1.8±1.8	0.402
p-JNK - negative cytoplasmic	78.2±41.8	72.3±26.7	80.0±16.7	0.606
FoxO3a - strong nuclear	13.5±4.8	3.2±5.4*	0.0±0.1*†	<b>&lt;0.001</b>
FoxO3a - weak nuclear	8.8±2.6	15.6±11.9*	3.3±3.8*††	<b>&lt;0.001</b>
FoxO3a - moderate nuclear	68.6±10.7	15.8±16.9*	0.6±0.8*†	<b>&lt;0.001</b>
FoxO3a - negative nuclear	9.1±3.6	65.4±25.4*	96.1±4.3*†	<b>&lt;0.001</b>
FoxO3a - strong cytoplasmic	0.0±0.0	19.5±32.7	5.0±14.4	0.102
FoxO3a - weak cytoplasmic	10.0±13.8	19.7±16.9*	41.6±27.0*†	<b>0.002</b>
FoxO3a - moderate cytoplasmic	83.5±10.6	35.4±36.4*	46.4±28.4	<b>0.014</b>
FoxO3a - negative cytoplasmic	6.5±4.9	25.3±28.6	7.0±8.8†	<b>0.015</b>

NOE: normal oral epithelium; OED: oral epithelial dysplasia; OSCC: oral squamous cell carcinoma

\**p*<0.05 versus NOE, †*p*<0.05 versus OED, Text ANOVA/Bonferroni (media ± DP).

**Table 3.1.3:** Mean and intensity of immunostained cells in membrane, cytoplasm and nucleus of low and high-risk oral epithelial dysplasia.

Antibody/Staining	OED		<i>p</i>
	Low Risk	High Risk	
p-AKT - nuclear	9.71±9.58	6.11±6.25	0.333
p-AKT - perinuclear	25.10±8.06	15.25±9.55	<b>0.022</b>
p-AKT - strong cytoplasmic	15.93±10.59	16.36±11.91	0.933
p-AKT - moderate cytoplasmic	34.12±5.75	37.50±10.41	0.384
p-AKT - weak cytoplasmic	45.60±13.01	40.01±11.43	0.321
p-AKT - negative cytoplasmic	4.4±2.8	6.1±5.5	0.407
p-AKT - strong membrane	3.33±4.37	16.92±10.09	<b>0.002</b>
p-AKT - moderate membrane	11.60±8.06	28.33±9.64	<b>0.001</b>
p-AKT - weak membrane	17.65±4.96	20.87±9.91	0.375
p-AKT - negative membrane	67.4±11.3	33.9±20.8	<b>&lt;0.001</b>
Ki67 - strong nuclear	8.30±7.51	15.33±12.38	0.142
Ki67 - weak nuclear	12.26±3.68	14.32±4.02	0.247
Ki67 - moderate nuclear	6.87±3.87	7.81±2.57	0.530
Ki67 – nuclear	23.79±9.76	27.77±8.34	0.340
p-JNK - strong nuclear	15.47±11.33	6.50±7.25	<b>0.049</b>
p-JNK - weak nuclear	29.35±11.01	35.59±12.61	0.254
p-JNK - moderate nuclear	22.17±14.07	17.14±17.16	0.483
p-JNK - negative nuclear	33.03±15.50	40.78±20.99	0.360
p-JNK - strong cytoplasmic	0.32±0.28	0.51±0.47	0.286
p-JNK - weak cytoplasmic	25.37±23.37	24.67±26.87	0.951
p-JNK - moderate cytoplasmic	2.09±3.19	2.39±4.20	0.859
p-JNK - negative cytoplasmic	72.22±25.85	72.46±28.87	0.985
FoxO3a - strong nuclear	4.39±6.50	1.96±4.04	0.331
FoxO3a - weak nuclear	21.25±12.03	9.98±9.02	<b>0.029</b>
FoxO3a - moderate nuclear	22.83±13.08	8.76±18.02	0.061
FoxO3a - negative nuclear	51.51±15.00	79.28±26.71	<b>0.010</b>
FoxO3a - strong cytoplasmic	18.58±30.69	20.51±36.24	0.899
FoxO3a - weak cytoplasmic	29.12±18.39	10.33±8.28	<b>0.012</b>
FoxO3a - moderate cytoplasmic	26.87±26.80	43.89±43.81	0.311
FoxO3a - negative cytoplasmic	25.42±22.42	25.27±35.00	0.991

OED: oral epithelial dysplasia

\**p*<0.05, Test t de Student (media ± DP).

**Table 3.1.4:** Mean and intensity of immunostained cells in membrane, cytoplasm and nucleus of low and high-risk oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma.

Antibody/Staining	NOE	OED		OSCC	p
		Low Risk	High Risk		
p-AKT - nuclear	1.8±4.7	9.71±9.58	6.11±6.25	21.2±19.0*†‡	<b>0.005</b>
p-AKT - perinuclear	14.3±8.1	25.10±8.06	15.25±9.55	15.1±9.5†	<b>0.029</b>
p-AKT - strong cytoplasmic	14.9±7.6	15.93±10.59	16.36±11.91	8.2±6.8	0.055
p-AKT - moderate cytoplasmic	44.8±9.5	34.12±5.75	37.50±10.41	28.2±12.3*	<b>0.005</b>
p-AKT - weak cytoplasmic	39.5±10.9	45.60±13.01	40.01±11.43	59.9±15.7*‡	<b>0.001</b>
p-AKT - negative cytoplasmic	0.8±0.6	4.4±2.8	6.1±5.5*	3.7±3.3	<b>0.047</b>
p-AKT - strong membrane	0.0±0.0	3.33±4.37	16.92±10.09	17.7±19.7*	<b>0.008</b>
p-AKT - moderate membrane	0.0±0.0	11.60±8.06	28.33±9.64*†	18.9±11.9*	<b>&lt;0.001</b>
p-AKT - weak membrane	0.0±0.0	17.65±4.96	20.87±9.91*	52.6±21.7*†‡	<b>&lt;0.001</b>
p-AKT - negative membrane	100.0±0.0	67.4±11.3*	33.9±20.8*†	10.8±11.5*†‡	<b>&lt;0.001</b>
Ki67 - strong nuclear	1.9±2.0	8.30±7.51	15.33±12.38	48.1±49.6*†	<b>0.001</b>
Ki67 - weak nuclear	8.6±3.1	12.26±3.68	14.32±4.02*	16.3±4.8*	<b>&lt;0.001</b>
Ki67 - moderate nuclear	3.3±1.2	6.87±3.87	7.81±2.57	20.2±7.4*†‡	<b>&lt;0.001</b>
Ki67 - nuclear	12.3±4.1	23.79±9.76	27.77±8.34*	54.6±16.8*†‡	<b>&lt;0.001</b>
p-JNK - strong nuclear	48.3±13.7	15.47±11.33*	6.50±7.25*	1.1±1.3*†	<b>&lt;0.001</b>
p-JNK - weak nuclear	9.9±7.6	29.35±11.01	35.59±12.61	49.8±19.5*†	<b>&lt;0.001</b>
p-JNK - moderate nuclear	14.4±10.8	22.17±14.07	17.14±17.16	17.7±20.5	0.865
p-JNK - negative nuclear	27.5±13.0	33.03±15.50	40.78±20.99	31.4±14.3	0.415
p-JNK - strong cytoplasmic	0.1±0.3	0.32±0.28	0.51±0.47	0.9±1.0	0.166
p-JNK - weak cytoplasmic	21.5±42.0	25.37±23.37	24.67±26.87	17.4±16.5	0.787
p-JNK - moderate cytoplasmic	0.2±0.4	2.09±3.19	2.39±4.20	1.8±1.8	0.602
p-JNK - negative cytoplasmic	78.2±41.8	72.22±25.85	72.46±28.87	80.0±16.7	0.804
FoxO3a - strong nuclear	13.5±4.8	4.39±6.50*	1.96±4.04*	0.0±0.1*†	<b>&lt;0.001</b>
FoxO3a - weak nuclear	8.8±2.6	21.25±12.03*	9.98±9.02	3.3±3.8*†	<b>&lt;0.001</b>
FoxO3a - moderate nuclear	68.6±10.7	22.83±13.08*	8.76±18.02*†	0.6±0.8*†	<b>&lt;0.001</b>
FoxO3a - negative nuclear	9.1±3.6	51.51±15.00*	79.28±26.71*†	96.1±4.3*†‡	<b>&lt;0.001</b>
FoxO3a - strong cytoplasmic	0.0±0.0	18.58±30.69	20.51±36.24	5.0±14.4	0.208
FoxO3a - weak cytoplasmic	10.0±13.8	29.12±18.39	10.33±8.28	41.6±27.0*‡	<b>0.001</b>
FoxO3a - moderate cytoplasmic	83.5±10.6	26.87±26.80*	43.89±43.81	46.4±28.4	<b>0.019</b>
FoxO3a - negative cytoplasmic	6.5±4.9	25.42±22.42*	25.27±35.00*	7.0±8.8	<b>0.040</b>

NOE: normal oral epithelium; OED: oral epithelial dysplasia; OSCC: oral squamous cell carcinoma

\*p<0.05 versus NOE, †p<0.05 versus Low Risk OED, ‡p<0.05 versus High Risk OED; Test ANOVA/Bonferroni (media ± DP).

### **3.2 Capítulo 02:** Loss of heterozygosity and immunoexpression of PTEN in oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinoma.

#### **Title Page**

#### **Original Article**

Loss of heterozygosity and immunoexpression of PTEN in oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinoma.

#### **Authors and name affiliations**

Filipe Nobre Chaves<sup>1</sup>, Thâmara Manoela Marinho Bezerra<sup>1</sup>, Debora Chaves Moraes<sup>2</sup>, Sara Ferreira dos Santos Costa<sup>3</sup>, Paulo Goberlanio Barros Silva<sup>1</sup>, Ana Paula Negreiros Nunes Alves<sup>1</sup>, Carolina Cavalieri Gomes<sup>4</sup>, Ricardo Santiago Gomez<sup>3</sup>, Vanessa Fátima Bernardes<sup>4</sup>, Karuza Maria Alves Pereira<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Dental Clinic, Division of Oral Pathology, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

<sup>2</sup>Department of Surgery, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup>Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>5</sup>Department of Morphology, School of Medicine, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

\*Correspondence author: PhD. MSc. DDS. Karuza Maria Alves Pereira

Department of Morphology, School Medicine

Federal University of Ceará

Rua Delmiro de Farias s/n - Rodolfo Teófilo - CEP 60416-030 - Fortaleza - CE, Brazil.

Phone / Fax Number: +55 85 3366 8471.

E-mail: [karuzaalves@yahoo.com.br](mailto:karuzaalves@yahoo.com.br)

**Conflict of interest statement:** None declared.

**Running title:** LOH of PTEN in oral epithelial dysplasias and OSCC

**Abstract**

**BACKGROUND:** Oral Epithelial Dysplasia (OED) is a risk factor for developing subsequent oral squamous cell carcinomas (OSCC). Loss of heterozygosity (LOH) profiles have been validated as risk predictors of malignant transformation of OED. It is still unknown if PTEN allelic loss also occurs in initial stage malignant lesions and if the allelic loss is involved as one of the mechanisms of oral carcinogenesis. **OBJECTIVE:** To analyse LOH avaluation in two chromosomal regions of PTEN in OEDs and OSCCs samples, and immunohistochemical of the PTEN protein and compare if LOH of this gene is involved in protein expression. **METHODS:** Formalin-fixed paraffin-embedded samples of 19 OED and 16 OSCC were included to immunohistochemistry and LOH analysis. For the immunohistochemical study, 5 random fields with greater immunoreactivity were photomicrographed and it was done the count of keratinocytes which showed cytoplasmic and nuclear staining. For LOH analysis, 2 polymorphic microsatellite markers (AFMA086WG9 and D10S1765) localizing to chromosomes 10 were used to detect LOH. **RESULTS:** AFMA086WG9 marker demonstrated allelic retention in 89.5% of OEDs cases and in 100% of OSCCs cases. D10S1765 marker demonstrated LOH in 57.2% of OEDs and 50% of OSCCs. Higher nuclear immunostaining was detected in cases of OSCCs when compared to OEDs and control group ( $p < 0.001$ ) and strong cytoplasmic immunostaining was more present in OSCCs ( $p < 0.045$ ). **CONCLUSIONS:** We provide evidence that the allelic loss of PTEN is present in premalignant oral lesions and OSCCs, however the LOH of PTEN seems not to influence its protein expression.

**Keywords:** Loss of heterozygosity; oral epithelial dysplasia; oral squamous cell carcinoma; PTEN; immunohistochemistry.

## Introdução

O câncer é um problema de saúde pública mundial, apresentando uma alta incidência e elevado índice de mortalidade.<sup>1</sup> O câncer oral possui a 6ª maior taxa de mortalidade dentre os cânceres humanos, sendo o carcinoma epidermóide oral (CEO) o subtipo mais frequente.<sup>1,2</sup> Lesões potencialmente malignas (LPMs) estão associadas à carcinogênese oral, e CEOs têm sido documentados em associação ou precedidos por LPM, e sua presença pode representar fator de risco para o desenvolvimento do CEOs.<sup>3</sup> O exame histopatológico das LPMs deve demonstrar displasia epitelial para prever malignidade.<sup>4,5</sup> Entretanto, a progressão para o fenótipo maligno não é observada na maioria das LPMs e soma-se a isso, a baixa reprodutibilidade dos critérios de classificação microscópica das lesões displásicas que é muito baixa, o que gera significativas divergências em termos diagnósticos.<sup>4,6,7</sup> Assim, a identificação de marcadores moleculares que possam sinalizar o comportamento e a transformação maligna são muito relevantes, levantando a busca para a identificação de genes e proteínas preditores de prognóstico.

*PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10)* é um supressor tumoral que atua na via PI3K/AKT, uma das mais desreguladas no câncer.<sup>8</sup> Seus principais substratos são PIP<sub>3</sub> (*Phosphatidylinositol triphosphate*) e o oncogene AKT (*Protein kinase B*), os quais são importantes sinalizadores para o crescimento, proliferação e sobrevivência celular.<sup>9-12</sup> A perda de PTEN têm sido relatadas em uma variedade de LPMs e cânceres humanos, incluindo CEO.<sup>13</sup> Recentes estudos têm evidenciado que a perda alélica ou perda de heterozigosidade (LOH) está envolvida na predição de transformação maligna de leucoplasias orais<sup>6,14</sup> mostrando-se relacionada na perda funcional de genes supressores tumorais (TSGs).<sup>15,16</sup>

Estudos com CEOs,<sup>17</sup> cânceres de cabeça e pescoço<sup>18</sup> e diversas localizações<sup>9,10,15,19-27</sup> mostram LOH no *locus* 10q-23.3, onde está localizado o gene PTEN. Entretanto, ainda não está totalmente conhecido se a perda alélica de PTEN ocorre também em estágios iniciais de lesões malignas e se esse fenômeno gênico se mostra envolvido na carcinogênese oral.

Nesse contexto, este estudo buscou realizar a análise de LOH em duas regiões microsatélites de PTEN (intergênica e intragênica) em amostras de DEOs e CEOs com diferentes gradações histológicas de malignidade, e também a avaliação imunistoquímica da proteína PTEN, a fim de investigar se a LOH desse gene se mostra envolvida na expressão proteica em diferentes estadiamentos histológicos de DEOs e CEOs.

## Material e Métodos

### Delineamento do estudo e amostra

Foi realizado um estudo observacional, analítico e transversal, o qual foi previamente aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará sob protocolo nº 94432. A população do estudo foi compreendida por blocos de parafina oriundos de biópsias incisionais de lesões malignas orais (carcinomas epidermóides orais) e potencialmente malignas (com diferentes graus histopatológicos de displasias epiteliais) de pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral no período de dezembro de 2012 a março de 2016.

Foram incluídos 20 casos de DEO, 20 casos de CEO e 5 casos de mucosa oral morfológicamente normal. As amostras de DEOs foram gradadas e classificadas em baixo e alto risco de malignidade para predição de transformação maligna<sup>5,28</sup> e as amostras de CEOs foram gradadas e classificadas em baixo e alto grau de malignidade.<sup>29</sup> Os registros dos casos de DEOs foram revistos e nenhum dos pacientes portadores de DEO apresentava história prévia ou atual de câncer oral.

### Extração de DNA

Para realizar a microdissecção manual das amostras, após confirmação diagnóstica, os casos de DEOs e CEOs corados em hematoxilina-e-eosina (H&E) foram revisados por um patologista no microscópico óptico (aumento de 100X) para identificação e delimitação do tecido normal e tecido epitelial lesional.

Na amostra de DEO, o epitélio foi microdissecado sendo considerado como tecido lesional, fonte de DNA lesional, e o tecido conjuntivo subjacente usado como o controle, fonte de DNA de tecido não lesional. Lâmina própria e submucosa foram considerados como tecidos normais, enquanto que o tecido epitelial com aspecto histológico de normalidade não foi considerado o tecido normal, e descartados face a possibilidade do campo de cancerização.

Na amostra de CEO, áreas do parênquima tumoral foram microdissecados, sendo considerado o tecido lesional, fonte de DNA lesional, áreas que apresentavam invasão tumoral e com alterações citológicas. O estroma subjacente não tumoral distante ou outros tecidos adjacentes como adiposo ou linfoide, foram usados como o controle não lesional, ou seja, fonte de DNA de tecido não lesional correspondente.

DNA foi extraído usando o kit QIAamp® DNA FFPE Tissue, de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen, Hilden, Germany), após desparafinização. Para mensurar a concentração e pureza do DNA de cada tecido, foi utilizado o equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA), utilizando os valores de 1,7-



1,9 para a razão de absorbância A260/A280 e 2,0 para a razão A260/230 como referência. A integridade do DNA foi inicialmente analisada com o *primer* do gene  $\beta$ -globulina.

### Análise da LOH

A análise LOH foi realizada de forma cega para os resultados da avaliação histopatológica. Em virtude de perdas decorrentes do processamento, foram analisados 19 casos de DEO e 16 casos de CEO.

Foi realizado a amplificação dos tecidos normais e lesionais através da *Polimerase Chain Reaction* (PCR), utilizando dois marcadores de região microssatélites AFMA086WG9 (154bp) e D10S1765 (175bp), próximas ao gene *PTEN*, localizados nas regiões cromossômicas 10q23.3 e 10q23.31 respectivamente, conforme descritos na literatura.<sup>6,27</sup>

A sequência utilizada para o marcador AFMA086WG9 foi: *forward*, 5'-AAATGTACGGTTCATTGACTT-3' FAM; *reverse*, 5'-GACTGACTACAAATGGGCA-3'. Para o marcador D10S1765, a sequência utilizada foi: *forward*, 5'-ACACTTACATAGTGCTTTCTGCG-3' VIC; *reverse*, 5'-CAGCCTCCCAAAGTTGC-3'.

Para a PCR com os marcadores microssatélites foi realizado um mix contendo 2 a 4 $\mu$ L da amostra de DNA genômico, 3,75 $\mu$ L de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 1,5 $\mu$ L de tampão de PCR, 0,75 $\mu$ L de cloreto de magnésio, 0,25 $\mu$ L de cada primer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (*forward* e *reverse*) e 0,12 $\mu$ L de Taq DNA Polimerase Recombinante (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA) e 6,38 $\mu$ L de água de injeção (Eurofarma, São Paulo, Brasil), obtendo-se um volume final de 15 $\mu$ L. As condições da PCR serão as mesmas para os tecidos normais e lesionais.

Dentre as condições térmicas da PCR, a desnaturação inicial de 95 °C por 10 minutos foi seguida dos ciclos de amplificação (desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 64°C por 30 segundos e extensão a 70°C por 30 segundos para o marcador D10S1765; e 96°C por 10 segundos, 58°C por 30 segundos e 70°C por 30 segundos para o marcador AFMA086WG9) e de uma extensão final de 70°C por 30 segundos, perfazendo um total de 45 ciclos (adaptado de Bae et al.<sup>20</sup> e Farias et al.<sup>30</sup>).

Todos os PCRs foram realizados para os tecidos normais e alterados sob as mesmas condições. Os produtos amplificados foram detectados em gel de poliacrilamida 8% e em seguida submetidos a eletroforese capilar em um sequenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystem, Foster City, CA). A intensidade de coloração e espessura das bandas são parâmetros para a diluição dos produtos da PCR de acordo com os pares de cada marcador microssatélite, sendo utilizadas para análise de perda alélica, determinando-se a diluição de alguns produtos

de PCR em água milliQ, na proporção de 1:5 a 1:20 bem como a não diluição de alguns produtos, variando de 1:0 a 3:0 (apenas produto PCR). Em seguida, 1-3 $\mu$ L do produto foi homogeneizado com 12 $\mu$ L de formamida e 0,5 $\mu$ L de padrão (Genescan 500 Liz – Applied Biosystem). Ao final, foram inseridos na placa 9 $\mu$ L (Microplate PCR-96-AB-C, Union City, CA, EUA) e em seguida desnaturados por 5 minutos a 95° no termociclador para análise por eletroforese capilar pelo equipamento ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Para a análise das corridas, foi utilizado o software GeneMapper *software version 3.0* (Applied Biosystem, Foster City, CA) interligado com *Excel spreadsheet*. A LOH foi calculada de acordo com a razão entre a altura do alelo curto do tecido normal dividido por seu alelo longo e a altura do alelo curto do tecido lesional dividido pela altura de seu alelo longo. Foi considerada LOH quando um dos alelos (pico) do tecido lesional estivesse ausente ou menor em mais de 50% da sua altura, comparada com os alelos do tecido normal (escore < 0,5 ou > 2,0). As amostras que apresentarem valores entre 0,5 e 2,0 foram consideradas casos de retenção alélica.<sup>6,27,31</sup>

A frequência de perda alélica (*fraction of allelic loss*) foi calculada para cada amostra e marcador. O cálculo foi realizado pela razão entre o número de *loci* que apresentaram LOH e o número de *loci* que foram informativos.<sup>27</sup>

### Reação imunoistoquímica

Para a reação imunoistoquímica, após a confirmação diagnóstica, os espécimes foram submetidos a cortes 3 $\mu$ m de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co®, St Louis, MO, USA). Todas as amostras de tecido foram processadas utilizando métodos padrão, e secções em série foram utilizadas para a reação.

Após desparafinização e reidratação, as lâminas foram submetidas a recuperação antigênica induzida por calor Panela Pascal (pressurizada) (DakoCytomation), onde as secções foram submetidas a temperatura de até 125-126°C, por 30 segundos em solução de recuperação antigênica Citrato pH 6,0 (ácido cítrico – 0,1 M). Seguiu-se a lavagem pós-recuperação com PBS/Tween e o bloqueio da Peroxidase Endógena em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos com troca de solução a cada 10 minutos. Após nova lavagem com PBS/Tween, seguiu-se o bloqueio da Proteinase (Albumina 1%) por 10 minutos à temperatura ambiente (25°C). Posteriormente o material foi examinado e submetido a técnica de estreptavidina-biotina (LSAB® Labelled Streptavidin-Biotin) - através da detecção indireta simples de

moléculas com uso do anticorpo primário anti-PTEN (Rabbit policlonal, Abcam®, [ab31392], anticorpo policlonal de coelho) na diluição de 1:400, overnight a uma temperatura de 4°C, seguindo as recomendações estabelecidas pelo fabricante. Seguiu-se a incubação secundária com o Kit Dako LSAB Biotina (DAKO®, Carpentaria, CA, EUA) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Uma nova lavagem com P.B.S/Tween foi realizada seguida da incubação terciária utilizando o Kit Dako Liquid Dab-Chromogen (DAKO®, Carpentaria, CA, EUA), durante 5 minutos numa câmara escura e a hematoxilina de Harris foi utilizada para contra coloração. Finalizando, foi realizada lavagem em água corrente em três banhos de 1 a 2 minutos, passagens em sequencias de álcool etanol absoluto (1 minuto) e xilol (1 minuto) respectivamente e montagem em resina Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Como controle positivo, foi utilizado o Adenocarcinoma de Mama, este incluído em cada reação juntamente com as amostras. Para controle negativo, as secções foram incubadas sem a aplicação do anticorpo primário, este substituído por tampão fosfato-salino (PBS).

#### Análise imunoistoquímica

Os parâmetros positivos para a marcação do anticorpo em todas as amostras foram as células que exibiram coloração acastanhada nuclear e/ou citoplasmática. Foi considerada condição negativa de expressão a completa ausência de coloração. Foram selecionados cinco campos (adaptado de Kruse-Losler et al.<sup>32</sup>) visualizados através do microscópio óptico Leica DM2000, com ampliação de 400x, e fotomicrografados através do microscópio com câmera digital acoplada Leica DFC290 HD utilizando o *software Las* na resolução máxima. Os campos com maior imunomarcação (*hot spots*) foram selecionados para a análise e fotomicrografia.<sup>33</sup>

A análise quantitativa da expressão proteica foi realizada pela média do número de células quanto a intensidade de imunomarcação em cada campo selecionado.<sup>3,34</sup> Para tanto, foi utilizado o programa *Imaging Processing and Analysis in Java* (ImageJ®, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), onde dois pesquisadores fizeram a análise em intervalos de tempo distintos sem conhecimento dos dados clínicos e histopatológicos previamente calibrados, com um coeficiente de concordância de 0,86 (86%).

As análises qualitativas foram realizadas simultaneamente em cada campo fotomicrografado por meio da contagem de células imunopositivas combinadas com as suas correspondentes intensidades (forte, moderado e fraco) de imunomarcação nas localizações celulares específicas (núcleo e citoplasma).<sup>3,35</sup>

#### Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente usando *Statistical Package for the Social Science software version 20.0* (SPSS, Chicago, IL). O teste estatístico Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn foi usado para análise imunoistoquímica. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação entre os grupos DEO e CEO desse estudo. O teste de Fisher foi usado para comparar o LOH entre os grupos. Todos os testes foram considerados significativos quando o valor de  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

Baseado na imunopressão de PTEN nos casos de LOH de DEO ( $n=6$ ,  $0,33 \pm 0,68\%$ ) e de CEO ( $n=4$ ,  $15,71 \pm 6,75\%$ ) observado nesse estudo e adotando uma confiança de 95%, estima-se um poder de 99,51% da presente amostra em rejeitar a hipótese nula deste trabalho.

### Análise imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica de PTEN revelou imunomarcção citoplasmática e nuclear em CEOs, DEOs e controles em todas as amostras avaliadas (Figura 3.2.1). O padrão de imunopressão de PTEN mostrou-se tanto homogêneo quanto heterogênea (áreas positivas e negativas) nas amostras de CEOs e DEOs. Nos casos controles dessa pesquisa apenas foi observado um padrão homogêneo de imunomarcção.

A média de células com imunomarcção nuclear foi significativamente maior em CEOs quando comparado com DEOs e controle ( $p < 0.001$ ). A imunomarcção nuclear foi maior nos controles ( $9,56 \pm 13,11$ ) quando comparado às DEOs ( $1,25 \pm 2,48$ ), entretanto sem significância estatística. A média de células com imunomarcção citoplasmática também foi significativamente maior nos CEOs quando comparado com DEOs e controles ( $p = 0.012$ ), havendo um maior padrão de marcação citoplasmática forte nos CEOs do que nas DEOs ( $p = 0.045$ ) (Tabela 3.2.1).

### Análise da LOH

Um total de 16 casos de CEOs e 19 casos de DEOs foram analisados a LOH utilizando o marcador microssatélite AFMA086WG9, no interior do locus gênico de PTEN, e o marcador microssatélite intergênico D10S1765.

Para o marcador AFMA086WG9, todas as amostras de CEOs e DEOs foram informativas. LOH foi observada em apenas 2 casos de DEOs, havendo 100% de retenção alélica nos casos de CEOs. Para o marcador D10S1765 verificou-se LOH em 57,14% (08 casos)

de DEO e 50% (04 casos) dos casos de CEOs. Apenas 1 caso de DEO apresentou LOH para ambos os marcadores (amostra 11). A amostra 5 de DEO apresentou LOH para AFMA086WG9 de PTEN e foi não informativo para D10S1765 (Tabela 3.2.2).

A frequência de perda alélica (FPA) foi calculada para cada amostra e marcador. Para o marcador D10S1765, FPA foi observado em 57,14% das DEO e em 50% dos CEOs, entretanto sem diferença significativa. Para marcador AFMA086WG9, a FPA foi observada em 10,52% das DEOs, não ocorrendo em CEOs (Tabela 3.2.2). Na tabela 3.2.3 podemos observar que nas DEOs examinadas houve significativamente mais casos exibindo LOH na região intergênica (57,14%) do que na região intragênica (10,52%) de PTEN ( $p = 0,003$ ). Nos casos de CEOs, também foi observado diferença de LOH entre os marcadores ( $p = 0,007$ ), na qual apenas o marcador D10S1765 apresentou casos de perda alélica.

Buscando associar a progressão histopatológica de malignidade (avaliada de acordo com o sistema de gradação binária) nos casos de DEOs e CEOs examinados com LOH, verificou-se que nos casos de DEO, LOH em *PTEN* não variou com a progressão da malignidade. Nos casos de CEOs, observou-se LOH apenas para o marcador D10S1765, estando restrita aos casos de alto grau de malignidade ( $p = 0,011$ ) (Tabela 3.2.4).

Associação entre os casos de DEOs e CEOs que exibiram LOH para o marcador D10S1765 e a expressão proteica para PTEN foi observada na tabela 3.2.5. Em CEOs foi observado um maior número de células com imunomarcção nuclear em relação as DEOs com LOH ( $p = 0,003$ ). Não houve associação entre a imunexpressão citoplasmática de PTEN entre os grupos analisados ( $p = 0,503$ ).

## Discussão

É amplamente aceito que CEOs podem ser precedidos por LPM, onde a presença de DEO parece ser um importante indicador prognóstico de seu potencial de transformação maligna.<sup>4</sup> Entretanto, a acurácia dos exames clínicos e histopatológicos muitas vezes é baixa na previsão da transformação maligna dessas lesões.<sup>6,14,36</sup> Assim, é destacada a necessidade de identificar marcadores moleculares que possam prever melhor a agressividade e o curso clínico das LPMs, sendo crucial compreender as vias moleculares desreguladas que regem a progressão da carcinogênese oral.<sup>8,37</sup> Nesse contexto, o presente estudo realizou a investigação de LOH de PTEN e sua imunexpressão em OSCC e OED.

Dados prévios publicados recentemente pelo nosso grupo evidenciou que a via PI3K/AKT está desregulada nos cânceres, apresentando o *PTEN* como um gene supressor para essa via, por meio da desfosforilação de PIP3, este responsável pela ativação do AKT via

proteínas PDK-1 (fosfatidilinositol quinase dependente 1).<sup>3</sup> Entretanto, pouco se conhece como essa via está envolvida no processo de transformação maligna de LPMs. Perda de heterozigossidade (LOH) foi validado como preditor de transformação maligna em LPMs<sup>6,14,27</sup> e em carcinomas de diversas localizações.<sup>8,13,38</sup> Soma-se o fato que ainda não se sabe se a perda alélica de *PTEN* também ocorre em estágios iniciais de lesões malignas no estágio inicial e se está envolvida na carcinogênese oral. Assim, este estudo avaliou a LOH de *PTEN* e sua imunopressão em LPM displásicas e em CEO.

No presente estudo foi observado uma maior imunomarcção citoplasmática de *PTEN* nos carcinomas orais em relação a DEO e controle ( $p = 0.012$ ), onde acredita-se que esse aumento da expressão de *PTEN* pode ser entendido como uma tentativa de controle da expressão aumentada de AKT.<sup>39</sup> Recentemente, Chaves et al.<sup>3</sup> avaliaram a função de pAKT em DEOs e CEOs, observando uma imunomarcção citoplasmática significativamente maior nos carcinomas quando comparado às displasias e controles. Por ser um gene supressor tumoral, é sugerido que a maior imunopressão de *PTEN* em carcinomas possa indicar que ocorra uma inativação funcional de *PTEN* nessa malignidade e, dessa forma, hipotetiza-se que sua ação/função possa estar comprometida, perdendo a sua propriedade supressora tumoral. Os dados encontrados nessa investigação corroboram com Miyahara et al.<sup>40</sup>, os quais, ao avaliar LOH em displasias e carcinomas orais, observaram que a imunopressão de *PTEN* foi maior em CEO e displasias severas e moderadas quando comparada ao controle e DEO leve. Ao contrário do que foi observado na presente pesquisa, outros estudos sugerem uma tênue relação entre *PTEN* e CEOs, onde observaram que as alterações genéticas no *PTEN* são raras, sugerindo que este desempenha um papel crucial, mas limitado.<sup>17,41-43</sup> Kurasawa et al.<sup>44</sup> mostraram que a hipermetilação da região promotora de *PTEN* é frequente neste tumor, sendo um mecanismo importante de silenciamento epigenético que pode contribuir para o desenvolvimento neoplásico.

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, uma reduzida imunopressão de *PTEN* tem sido relatada em diversos tipos de câncer<sup>23,25,45,46</sup>. Squarize, Castilho e Santos Pinto<sup>47</sup> em estudo com CEOs, evidenciaram que a imunopressão de *PTEN* foi tipicamente localizada no citoplasma, às vezes mostrando uma coloração distintiva próxima da membrana celular, preferencialmente em CEOs bem diferenciados. Tais achados foram similarmente observados nas amostras do presente estudo, a qual era composta por CEOs bem e moderadamente diferenciados. Nesse contexto, é sugerido que a perda da função supressora tumoral de *PTEN* ocorre em estágios iniciais da carcinogênese oral,<sup>48</sup> como evidenciado em cânceres endometriais, onde a mutação de *PTEN* também foi detectada em lesões preneoplásicas.<sup>49</sup> No

presente estudo, nas DEO foi evidenciada uma baixa imunexpressão citoplasmática de PTEN, suscitando que presença de PTEN parece não influir na tumorigênese nestes casos. Os autores do presente estudo sugerem que PTEN possa não estar inserido diretamente no desenvolvimento de neoplasias orais, mas sim, secundariamente por meio da ativação da via PI3K/AKT através do aumento da concentração de PIP<sub>3</sub>.

Hodakoski et al.<sup>50</sup> relatam que modificações translacionais podem alterar a dosagem celular de PTEN através da sua maior secreção e entrada celular. PTEN-L é uma variante pós-translacional de PTEN que, uma vez secretada, possui a capacidade de entrar em outras células, aumentando, portanto, os níveis intracelulares dessa proteína.<sup>50,51</sup> Hodakoski et al.<sup>50</sup> relatam ainda que a sinalização intracelular de PTEN pode ser regulada por P-REX2 (*phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 2*), que possui a habilidade de inibir a atividade fosfatase de PTEN direcionada a PIP<sub>3</sub>, aumentando a via de sinalização de PI3K nessas células. Esses achados possibilitam inferir que a proteína PTEN parece ser mais comumente inativada do que seu gene, uma vez que estudos mostram ausência de mutação<sup>43,47</sup> e deleção homozigótica desse gene em casos de CEOs.<sup>40,41</sup>

A maioria dos TSGs requerem a inativação de ambos os alelos para ocorrência de tumorigênese.<sup>16,20</sup> É bem estabelecido que LOH ocorre em várias regiões cromossômicas de diferentes genes supressores de tumores,<sup>4,6,52,53</sup> estando envolvida na transformação maligna de LPMs,<sup>6,14</sup> uma vez que está associada inativação de TSGs.<sup>16</sup> LOH de *PTEN* pode ser avaliada através da escolha de marcadores microssatélites localizados próximo ou no interior do cromossomo 10q23-24.<sup>16</sup> Dessa forma, a presente pesquisa selecionou o marcador intragênico (AFMA086WG9) e intergênico (D10S1765), considerando que a amostra apresenta LOH em 10q-23 quando possuir pelo menos 1 microssatélite com LOH.<sup>54</sup>

Foi observado que LOH ocorreu com maior frequência na área intergênica, tanto em displasias ( $p = 0,003$ ) quanto em carcinomas ( $p = 0,007$ ), suscitando que tal região é geneticamente mais instável quando comparada com áreas intragênicas.<sup>55</sup> Altos índices de LOH em região intergênica de *PTEN* são relatados em diversas neoplasias, como em hepatocarcinomas,<sup>20</sup> carcinoma de mama<sup>21</sup> e adenocarcinoma de células claras de ovário.<sup>23</sup> No presente estudo, LOH ocorreu em 50% da amostra de CEO para o marcador D10S1765, não ocorrendo LOH para o marcador AFMA086WG9. Chakraborty et al.<sup>56</sup> observou LOH em apenas 4,5% das amostras para o marcador D10S1765. Mavros et al.<sup>17</sup> e Chakraborty et al.<sup>56</sup> observaram uma baixa frequência de LOH em relação a *PTEN*, 12% e 13% respectivamente, entretanto, não encontraram mutação na região codificadora da *PTEN*. O presente estudo observou LOH apenas para o marcador D10S1765, estando restrita aos casos de alto grau de

malignidade ( $p=0,011$ ), suscitando que a perda alélica acomete lesões cuja a malignidade encontra-se já desenvolvida. Corroborando para isso os estudos de Shao et al.<sup>18</sup> e Oki et al.<sup>9</sup> que observaram que LOH é mais comum em tumores pobremente diferenciados e em estágio avançado.

Como LOH em CEO ocorreu apenas na região intergênica, acredita-se que não somente *PTEN*, mas também outros genes que se situam na sua localização intergênica possam estar envolvidos na tumorigênese dos CEOs analisados. Conclusão semelhante também é descrita no estudo de Mavros et al (2002)<sup>17</sup> em pesquisa com LOH de *PTEN* em CEOs, bem como em hepatocarcinoma<sup>20</sup> e carcinoma de células claras renais.<sup>15</sup> Kurasawa et al.<sup>44</sup> não observaram mutações em *PTEN* na análise em CEOs, sugerindo que as alterações do gene *PTEN* não desempenham um papel fundamental na tumorigênese no CEOs. Assim, é proposto que mudanças na regulação epigenética são mais significativas do que mudanças estruturais no gene *PTEN* em CEOs. Corroborando para isso que a hipermetilação da região promotora de *PTEN* pode acontecer em CEOs, sendo um importante mecanismo de silenciamento epigenético que pode contribuir para a carcinogênese.<sup>57</sup>

LOH em DEO pode representar um mecanismo importante para o desenvolvimento de LPM orais para a progressão do câncer bucal, visto que no presente estudo, LOH ocorreu em ambos os marcadores, entretanto para o marcador D10S176 foi observado uma maior perda alélica. Miyahara et al.<sup>40</sup> que observou perda alélica de *PTEN* em 34,25% das leucoplasias orais, e com o estudo de Correa et al.<sup>27</sup>, que observou LOH em 56.3 % de queilites actínicas. Assim, sugere-se que alteração gênica possa ocorrer em estágios iniciais na região intergênica, onde a LOH pode ditar o processo de transformação maligna de LPM orais.<sup>52</sup> No entanto, a perda alélica de *PTEN* nas DEOs examinadas neste estudo não se mostrou envolvida no seu processo de malignização, uma vez que nas DEOs, a LOH parece ocorrer de forma independente do grau histológico da lesão. Achado similar ao encontrado no estudo de Miyahara et al.<sup>40</sup>, onde não foi observado diferença de perda alélica entre leucoplasias com DEO leve e DEO moderada e severa.

No presente estudo não foi observado um perfil de LOH associado a DEO ou a CEO para ambos os marcadores microssatélites utilizados, sugerindo que a LOH nestes marcadores não se traduz necessariamente na inativação de *PTEN*. Achados semelhantes foram observados por Correa et al.<sup>27</sup> em cânceres de lábio e queilites actínicas para *P16* (9p), *PTCH* (9q) e *TP53* (17p). Dentre os casos que exibiram LOH para o marcador D10S1765, não observamos diferença significativa na presença citoplasmática de *PTEN* entre os grupos estudados (Tabela 3.2.5). Achados semelhantes são relatados em outros cânceres, como em adenocarcinoma



de células claras de ovário.<sup>23</sup> Assim, a perda alélica em região intergênica não necessariamente levará a inativação dos TSGs localizados ao redor desse *locus*<sup>27</sup> e consequentemente das suas expressões proteicas.<sup>23</sup> Dessa forma, o processo de transformação maligna das DEOs pode envolver outros genes ou, até mesmo, outras formas da regulação do *PTEN* que não a LOH, como, por exemplo, mecanismos epigenéticos, mutações e instabilidade proteica.<sup>38,58</sup>

A presente pesquisa detectou a presença de heterogeneidade na imunomarcagem de PTEN nas amostras de CEOs e DEOs examinadas. A heterogeneidade tumoral é relatada em LPMs de mama<sup>59</sup> e tumores sólidos de diversas localizações<sup>46,54</sup> bem como em CEOs<sup>60,61</sup> e em LPMs orais.<sup>6</sup> Gomes et al. (2015)<sup>6</sup>, utilizando metodologia semelhante ao presente estudo na análise molecular da LOH, detectaram heterogeneidade em LPMs orais por meio da análise de biópsias do mesmo paciente em tempos e/ou localizações diferentes. Para estes autores a heterogeneidade molecular deve ser avaliada também por outros métodos moleculares e em grandes grupos amostrais. Idoate et al.<sup>54</sup> sugerem que um método para se estudar a heterogeneidade tumoral seja a realização de imunoistoquímica, a fim de se detectar as áreas de heterogeneidade tumoral, seguida da microdissecção a laser das áreas homogêneas. Apesar da presente pesquisa não objetivar estudar heterogeneidade tumoral, acreditamos que este fator pode ter influenciado na análise da LOH do estudo, uma vez que se observou baixa frequência de perda alélica nas amostras examinadas. Por fim a heterogeneidade tumoral observada nos espécimes examinados da presente pesquisa pode também ter contribuído para resultados com maiores imunomarcações citoplasmáticas de PTEN. Para Huhns et al.<sup>46</sup> a heterogeneidade da imunomarcagem de PTEN pode ser explicada se considerado o conceito de plasticidade na expressão de PTEN visto que isso causa flutuações na regulação negativa e re-expressão dessa proteína.

Esta pesquisa buscou realizar uma análise imunoistoquímica detalhada da localização intracelular de PTEN, uma vez que isto pode afetar significativamente seu comportamento celular.<sup>11,50,62</sup> O presente estudo detectou que as amostras de CEOs apresentavam aumento significativo da imunomarcagem nuclear em relação às DEOs e controles. A localização nuclear de PTEN tem sido relacionada a inibição do crescimento celular<sup>62,63</sup> e manutenção da estabilidade cromossômica da célula.<sup>12</sup> Uma vez no núcleo, PTEN exerce atividade supressora tumoral por mecanismos desconhecidos,<sup>64</sup> porém distintos daqueles relacionados a via PI3K/AKT.<sup>12</sup> No entanto, quando outros marcadores celulares da via PI3K/AKT também se mostram presentes no núcleo celular, como PI3K,<sup>65</sup> PIP<sub>3</sub>,<sup>66</sup> e AKT,<sup>12</sup> isso promoverá um efeito antiapoptótico de PTEN e interferirá na atividade supressora de crescimento celular de PTEN nuclear.<sup>12,62</sup>

Dessa forma, a imunexpressão nuclear de PTEN nas amostras de CEOs dessa pesquisa não necessariamente apontam para um papel antitumoral efetivo dessa proteína nesta localização celular. De forma semelhante a essa pesquisa, Bettendorf et al.<sup>22</sup> detectou taxas significativamente maiores de PTEN nuclear em áreas invasivas de câncer de próstata. A função celular de PTEN nuclear continua, nos dias atuais, a ser definida.<sup>11</sup> Interessantemente, em pesquisa realizada por Li et al.<sup>11</sup> mostra que PTEN pode estar presente no nucléolo da célula, exercendo importante papel na regulação da homeostasia nucleolar e na manutenção da sua morfologia. A presente pesquisa encontrou ainda uma presença significativa de PTEN nuclear nas amostras de CEOs com LOH (Tabela 3.2.5). A perda alélica pode afetar o padrão de imunolocalização celular dessa proteína nas amostras de CEOs analisadas, no entanto, como anteriormente discutido, a função de PTEN nuclear deve ser melhor esclarecida por outros métodos de estudos, uma vez que diversos fatores podem alterar sua função primordial nessa sublocalização celular.

Em conclusão, embora os estudos longitudinais sejam mais apropriados para atribuir um valor preditivo para a transformação maligna, este estudo transversal forneceu evidências de que a perda alélica de PTEN ocorreu na PML oral e no CEO. No entanto, LOH de PTEN não parece afetar a expressão protéica. Além disso, demonstrou-se uma heterogeneidade da expressão da proteína PTEN nas amostras analisadas de OED e CEO, independentemente da sua classificação histológica. Estudos moleculares que analisam áreas em que a expressão PTEN é homogênea podem ajudar a elucidar a transformação maligna no OED.

### **Agradecimento**

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Luiz Armando Cunha Melo do Laboratório de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, pela contribuição na estrutura física laboratoriais.

### **Financiamento**

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Chamada Universal MCTI/CNPQ N° 14/2013. Processo: 477887/2013-9.

### **Declaração de conflito de interesse**

Nenhum declarado

## Referências

1. Liu W, Shi LJ, Wu L, et al. Oral cancer development in patients with leukoplakia--clinicopathological factors affecting outcome. *PLoS One* 2012;7(4):e34773.
2. Dantas TS, de Barros Silva PG, Sousa EF, et al. Influence of Educational Level, Stage, and Histological Type on Survival of Oral Cancer in a Brazilian Population: A Retrospective Study of 10 Years Observation. *Medicine* 2016;95(3):e2314.
3. Chaves FN, Bezerra T, de Barros Silva PG, et al. Evaluation of the p-AKT, p-JNK and FoxO3a function in oral epithelial dysplasia. *Oral Dis* 2017;23(3):367-378.
4. Rosin MP, Cheng X, Poh C, et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Cancer Res* 2000;6(2):357-362.
5. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 2008;37(3):127-133.
6. Gomes CC, Fonseca-Silva T, Galvão CF, Friedman E, De Marco L, Gomez RS. Inter-and intra-lesional molecular heterogeneity of oral leukoplakia. *Oral Oncol* 2015;51(2): 178-181.
7. Muller S. Update from the 4th Edition of the World Health Organization of Head and Neck Tumours: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Head Neck Pathol* 2017;11:33-40.
8. Giudice FS, Squarize CH. The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. *J Carcinog Mutagen* 2013;Suppl 5.
9. Oki E, Kakeji Y, Baba H, et al. Impact of loss of heterozygosity of encoding phosphate and tensin homolog on the prognosis of gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21(5):814-818.
10. Schwarzenbach H, Eichelser C, Kropidlowski J, Janni W, Rack B, Pantel K. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 2012;18(20): 5719-5730.
11. Li B, Li J, Xu WW, et al. Suppression of esophageal tumor growth and chemoresistance by directly targeting the PI3K/AKT pathway. *Oncotarget* 2014;5(22):11576-11587.
12. Wang X, Huang H, Young KH. The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. *Aging (Albany NY)* 2015;7(12):1032-1049.
13. Snietura M, Jaworska M, Mlynarczyk-Liszka J, et al. PTEN as a prognostic and predictive marker in postoperative radiotherapy for squamous cell cancer of the head and neck. *PLoS*

- One 2012;7(3):e33396.
14. Fonseca-Silva T, Diniz MG, de Sousa SF, Gomez RS, Gomes CC. Association between histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia and loss of heterozygosity. *Histopathology* 2016;68(3):456-460.
  15. Velickovic M, Delahunt B, McIver B, Grebe SK. Intragenic PTEN/MMAC1 loss of heterozygosity in conventional (clear-cell) renal cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. *Modern Pathol* 2002;15(5):479-485.
  16. Couto, S.S. The Pathologist's Slide Reveals More Than Meets the Eye Loss of Heterozygosity and Cancer Biology. *Veterinary Pathology* 2011;48(1):236-244.
  17. Mavros A, Hahn M, Wieland I, et al. Infrequent genetic alterations of the tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 2002;31(5):270-276.
  18. Shao X, Tandon R, Samara G, et al. Mutational analysis of the PTEN gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;77(5):684-688.
  19. Abdullah JM, Farizan A, Asmarina K, et al. Association of loss of heterozygosity and PTEN gene abnormalities with paraclinical, clinical modalities and survival time of glioma patients in Malaysia. *Asian J Surg* 2006;29(4):274-282.
  20. Bae JJ, Rho JW, Lee TJ, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10q23 and mutation of the phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 tumor suppressor gene in Korean hepatocellular carcinoma patients. *Oncol Rep* 2007;18(4):1007-1014.
  21. Tokunaga E, Oki E, Kimura Y, et al. Coexistence of the loss of heterozygosity at the PTEN locus and HER2 overexpression enhances the Akt activity thus leading to a negative progesterone receptor expression in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2007;101(3):249-257.
  22. Bettendorf O, Schmidt H, Staebler A, et al. Chromosomal imbalances, loss of heterozygosity, and immunohistochemical expression of TP53, RB1, and PTEN in intraductal cancer, intraepithelial neoplasia, and invasive adenocarcinoma of the prostate. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47(7):565-572.
  23. Ho CM, Lin MC, Huang SH, et al. PTEN promoter methylation and LOH of 10q22–23 locus in PTEN expression of ovarian clear cell adenocarcinomas. *Gynecologic Oncol* 2009;112(2):307-313.
  24. Rizvi MM, Alam MS, Mehdi SJ, Ali A, Batra S. Allelic loss of 10q23.3, the PTEN gene locus in cervical carcinoma from Northern Indian population. *Pathol Oncol Res* 2012;18(2):309-13.

25. Quattrone A, Wozniak A, Dewaele B, et al. Frequent mono-allelic loss associated with deficient PTEN expression in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Modern Pathology* 2014;27(11):1510-1520.
26. Zaitsev Y, Oki E, Ando K, et al. Loss of heterozygosity of PTEN (encoding phosphatase and tensin homolog) associated with elevated HER2 expression is an adverse prognostic indicator in gastric cancer. *Oncology* 2015;88(3):189-94.
27. Correa GT, Bernardes VF, de Sousa SF, et al. Lip cancer and pre-cancerous lesions harbor TP53 mutations, exhibit allelic loss at 9p, 9q, and 17p, but no BRAFV600E mutations. *Tumor Biology* 2015;36(11):9059-9066.
28. Caldeira PC, Abreu MH, do Carmo MA. Binary system of grading oral epithelial dysplasia: evidence of a bearing to the scores of an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 2012;41(6):452-453.
29. Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol* 2007;15(4):376-383.
30. Farias LC, Gomes CC, Brito JA, et al. Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. *Hum Pathol* 2012;43(8):1229-1233.
31. Van Houten VM, Tabor MP, Van den Brekel MW, et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res* 2006;6(10):3803-3816.
32. Kruse-Lösler B, Flören C, Stratmann U, Joos U, Meyer U. Histologic, histomorphometric and immunohistologic changes of the gingival tissues immediately following mandibular osteodistraction. *J Clin Periodontol* 2005;32(1):98-103.
33. Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, et al. Phosphorylation of Akt (Ser473) predicts poor clinical outcome in oropharyngeal squamous cell cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(3):553-558.
34. Vasconcelos MG, Vasconcelos RG, Pereira de Oliveira DH, et al. Distribution of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and Glucose Transporter-1 in Human Tongue Cancers. *J Oral Maxillofac Surg* 2015;73(9):1753-1760.
35. Mourão RV, Júnior EC, Barros Silva PG, Turatti E, Mota MR, Alves AP. Study of the relationship between mononuclear inflammatory infiltrate and Ki-67 and basement membrane and extracellular matrix protein expression in radicular cysts. *Int Endod J* 2016;49, 447-53.
36. Pitiyage G, Tilakaratne WM, Tavassoli M, Warnakulasuriya S. Molecular markers in oral

- epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol Med* 2009;38(10):737-752.
37. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis* 2009;15(6):388-99.
  38. Xi Y, Chen Y. Oncogenic and therapeutic targeting of PTEN loss in bone malignancies. *J Cell Biochem* 2015;116(9):1837-1847.
  39. Watanabe S, Sato K, Okazaki Y, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane GY. Activation of PI3K-AKT pathway in oral epithelial dysplasia and early cancer of tongue. *Bull Tokyo Dent Col* 2009;50(3):125–33.
  40. Miyahara LAN, Pontes FSC, Burbano RMR, et al. PTEN allelic loss is an important mechanism in the late stage of development of oral leukoplakia into oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* 2017; Aug 31, [Epub ahead of print].
  41. Chen Q, Samaranayake LP, Zhou H, Xiao L. Homozygous deletion of the PTEN tumor-suppressor gene is not a feature in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2000;36(1):95-99.
  42. Snaddon J, Parkinson EK, Craft JA, Bartholomew C, Fulton R. Detection of functional PTEN lipid phosphatase protein and enzyme activity in squamous cell carcinomas of the head and neck, despite loss of heterozygosity at this locus. *Br J Cancer* 2001;84(12): 1630-1634.
  43. Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Shalmon B, et al. Mutational analysis of PTEN/PIK3CA/AKT pathway in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011;47(10):946-950.
  44. Kurasawa Y, Shiiba M, Nakamura M, et al. PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2008;19(6):1429-1434.
  45. Hu TH, Wang CC, Huang CC, et al. Down-regulation of tumor suppressor gene PTEN, overexpression of p53, plus high proliferating cell nuclear antigen index predict poor patient outcome of hepatocellular carcinoma after resection. *Oncol Rep* 2007;18(6):1417-1426.
  46. Hühns M, Salem T, Schneider B, Krohn M, Linnebacher M, Prall F. PTEN mutation, loss of heterozygosity, promoter methylation and expression in colorectal carcinoma: Two hits on the gene? *Oncol Rep* 2014;31(5):2236-2244.
  47. 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(7):379-384.
  48. Angadi PV, Krishnapillai R. Evaluation of PTEN immunoexpression in oral submucous fibrosis: role in pathogenesis and malignant transformation. *Head Neck Pathol* 2012;6(3):

- 314-321.
49. Mutter GL. Diagnosis of premalignant endometrial disease. *J Clin Pathol* 2002;55(5):326-331.
  50. Hodakoski C, Fine B, Hopkins B, Parsons R. Analysis of intracellular PTEN signaling and secretion. *Methods* 2015;77:164-171.
  51. Hopkins BD, Fine B, Steinbach N, et al. A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. *Science* 2013;341(6144):399-402.
  52. Zhang L, Poh CF, Williams M, et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles—validated risk predictors for progression to oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012;5(9):1081-1089.
  53. Graveland AP, Bremmer JF, de Maaker M, et al. Molecular screening of oral precancer. *Oral Oncol* 2013;49(12):1129-1135.
  54. Idoate MA, Echeveste J, Diez-Valle R, Lozano MD, Aristu J. Biological and clinical significance of the intratumour heterogeneity of PTEN protein expression and the corresponding molecular abnormalities of the PTEN gene in glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014;40(6):736-746.
  55. Wang Y, Liu X, Li Y. Target genes of microsatellite sequences in head and neck squamous cell carcinoma: Mononucleotide repeats are not detected. *Gene* 2012;506(1): 195-201.
  56. Chakraborty S, Azeem Mohiyuddin SM, Gopinath KS, Kumar A. Involvement of TSC genes and differential expression of other members of the mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2008;8:163–169.
  57. Sushma PS, Jamil K, Kumar PU, Satyanarayana U, Ramakrishna M, Triveni B. PTEN and p16 genes as epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on south Indian population. *Tumor Biol* 2016;37:7625–7632.
  58. Milella M, Falcone I, Conciatori F, et al. PTEN: multiple functions in human malignant tumors. *Front Oncol* 2015;5:24.
  59. Berman HK, Gauthier ML, Tlsty TD. Premalignant breast neoplasia: a paradigm of interlesional and intralesional molecular heterogeneity and its biological and clinical ramifications. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010;3(5):579-587.
  60. Diwakar N, Sperandio M, Sherriff M, Brown A, Odell EW. Heterogeneity, histological features and DNA ploidy in oral carcinoma by image-based analysis. *Oral Oncol* 2005;41: 416–422.
  61. Wang X, Fan M, Chen X, et al. Intratumor genomic heterogeneity correlates with histological grade of advanced oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006;42(7): 740-744.

62. Liu JL, Mao Z, LaFortune TA, et al. Cell Cycle–Dependent Nuclear Export of Phosphatase and Tensin Homologue Tumor Suppressor Is Regulated by the Phosphoinositide-3-Kinase Signaling Cascade. *Cancer Res* 2007;67(22):11054-11063.
63. Ginn-Pease ME, Eng C. Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. *Cancer Research* 2003;63(2):282-286.
64. Liu JC, Voisin V, Wang S, et al. Combined deletion of Pten and p53 in mammary epithelium accelerates triple-negative breast cancer with dependency on eEF2K. *EMBO Mol Med* 2014;6(12):1542-1560.
65. Metjian A, Roll RL, Ma AD, Abrams CS. Agonists Cause Nuclear Translocation of Phosphatidylinositol 3-kinase gamma. A G $\beta$  $\gamma$ -dependent pathway that requires the p110 $\gamma$  amino terminus. *J Biol Chem* 1999;274(39):27943-27947.
66. Tanaka K, Horiguchi K, Yoshida T, et al. Evidence that a phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate-binding protein can function in nucleus. *J Biol Chem* 1999;274(7):3919-3922.



## Tabelas

**Tabela 3.2.1:** Média do número de células quanto à intensidade de imunomarcção citoplasmática e nuclear em displasia epitelial oral e carcinoma epidermóides orais.

	Grupo			p-Valor
	Controle	DEO	CEO	
<b>PTEN percentual marcação</b>				
Nuclear	9,56±13,11	1,25±2,48	17,08±10,42*†	<b>&lt;0,001</b>
Citoplasma	93,77±9,44	93,39±13,56	98,58±3,01*†	<b>0,012</b>
Citoplasma (forte)	70,80±30,74	57,43±16,17	69,37±13,04†	<b>0,045</b>
Citoplasma (fraco)	22,97±22,87	36,04±10,02	29,21±11,51	0,054

\*p<0,05 *versus* Controle, †p<0,05 *versus* DEO

<sup>a</sup>Teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

Dados expressos em forma de média e desvio-padrão.

DEO: Displasia epitelial oral; CEO: Carcinoma epidermóide oral.

**Tabela 3.2.2:** Dados de LOH e FAL sobre CEO e DEO para os marcadores de microssatélites AFMA086wg9 e D10S1765

<i>Amostra</i>	<i>Gradação Histológica</i>	<i>Marcadores Microssatélites</i>		
<b>CEO</b>	<b>Adaptado de Silveira et al.<sup>29</sup></b>	<b>AFMA086WG9</b>	<b>D10S1765</b>	<b>FPA</b>
#1	CEO – Alto grau	●	◇	0
#2	CEO – Alto grau	●	●	0
#3	CEO – Alto grau	●	○	50%
#4	CEO – Alto grau	●	○	50%
#5	CEO – Alto grau	●	◇	0
#6	CEO – Alto grau	●	●	0
#7	CEO – Alto grau	●	◇	0
#8	CEO – Baixo grau	●	●	0
#9	CEO – Alto grau	●	○	50%
#10	CEO – Alto grau	●	○	50%
#11	CEO – Alto grau	●	●	0
#12	CEO – Baixo grau	●	◇	0
#13	CEO – Baixo grau	●	◇	0
#14	CEO – Baixo grau	●	◇	0
#15	CEO – Alto grau	●	◇	0
#16	CEO – Baixo grau	●	◇	0
FPA		0	50%	
<b>DEO</b>	<b>Adapatado de Warnakulasuriya et al.<sup>4</sup></b>	<b>AFMA086WG9</b>	<b>D10S1765</b>	<b>FPA</b>
#1	DEO – Baixo risco	●	◇	0
#2	DEO – Alto risco	●	◇	0
#3	DEO – Alto risco	●	●	0
#4	DEO – Baixo risco	●	●	0
#5	DEO – Alto risco	○	◇	100%
#6	DEO – Alto risco	●	○	50%
#7	DEO – Baixo risco	●	●	0
#8	DEO – Alto risco	●	○	50%
#9	DEO – Baixo risco	●	○	50%
#10	DEO – Baixo risco	●	●	0%
#11	DEO – Baixo risco	○	○	100%
#12	DEO – Alto risco	●	○	50%
#13	DEO – Baixo risco	●	◇	0%
#14	DEO – Baixo risco	●	○	50%
#15	DEO – Baixo risco	●	●	0%
#16	DEO – Alto risco	●	◇	0%
#17	DEO – Alto risco	●	●	0%
#18	DEO – Alto risco	●	○	50%
#19	DEO – Baixo risco	●	○	50%
FPA		10,52%	57,14%	

(●) Retenção Alélica; (○) LOH; (◇) não informativa = homozigoto ou não interpretável

FAL = frequência de perda alélica calculada dividindo o número de marcadores que apresentaram perda alélica pelo número de marcadores informativos. DEO: Displasia epitelial oral; CEO: Carcinoma epidermoide oral

**Tabela 3.2.3:** Padrão de perda de heterozigosidade e retenção alélica para cada marcador microssatélite em relação a diagnóstico histopatológico.

	AFMA086WG9		D10S1795		p-Valor
	Retenção	LOH	Retenção	LOH	
<i>DEO</i>	17 (89,5%)	2 (10,5%)	6 (42,8%)	8 (57,2%)	<sup>b</sup> <i>0,003</i>
<i>CEO</i>	16 (100%)	0	4 (50%)	4 (50%)	<sup>b</sup> <i>0,007</i>
<i>p-Valor</i>	0,498		1,000		

\* $p < 0,05$ , <sup>b</sup>Teste de Fisher.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

DEO: Displasia epitelial oral; CEO: Carcinoma epidermóide oral

**Tabela 3.2.4:** Padrão de perda de heterozigosidade em DEO, de alto e baixo risco, e CEO, de alto e baixo grau em relação aos marcadores microssatélites AFMA086WG9 e D10S1795.

	AFMa086wg9		D10S1795		p-Valor
	Retenção alélica	LOH	Retenção alélica	LOH	
<b>Gradação DEO<sup>a</sup></b>					
Baixo risco	10 58,8%	1 41,2%	4 50,0%	4 50,0%	0,111
Alto risco	7 100,0%	1 0,0%	2 33,3%	4 66,7%	0,090
<i>p-Valor</i>	<sup>b</sup> 1,000		<sup>b</sup> 0,287		
<b>Gradação CEO<sup>b</sup></b>					
Baixo Grau	5 100,0%	0 0,00%	1 100,0%	0 0,0%	1,000
Alto Grau	11 100,0%	0 0,00%	3 42,8%	4 57,2%	<b>0,011</b>
<i>p-Valor</i>	<sup>b</sup> 1,000		<sup>b</sup> 1,000		

\* $p < 0,05$ , <sup>b</sup>Teste de Fisher.

<sup>a</sup>Adaptado de Warnakulasuriya et al.<sup>4</sup>

<sup>b</sup>Adaptado de Silveira et al.<sup>29</sup>

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

DEO: Displasia epitelial oral; CEO: Carcinoma epidermoide oral.

**Tabela 3.2.5:** Padrão de perda de heterozigosidade em DEO e CEO para o marcador D10S1765 em relação a imunexpressão nuclear e citoplasmática de PTEN.

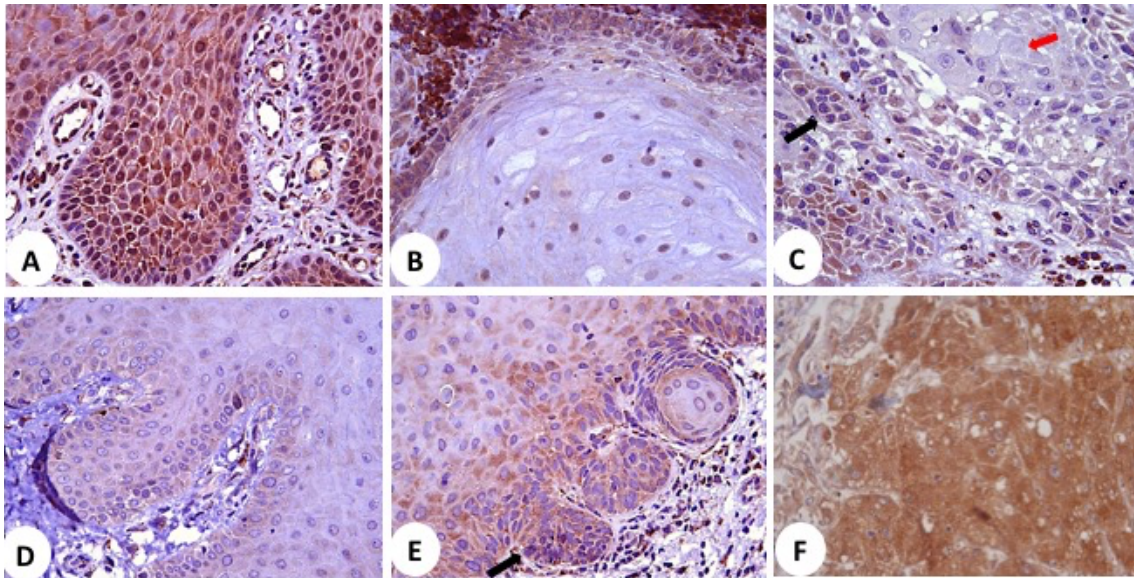
	Retenção Alélica			LOH		
	DEO	CEO	p-Valor	DEO	CEO	p-Valor
<b>PTEN marcação (%)</b>						
Nuclear	2,69±4,03	10,25±9,11	<sup>b</sup> 0,262	0,33±0,68	15,71±6,75	<sup>b</sup> 0,003
Citoplasma	86,85±23,70	97,29±3,13	<sup>b</sup> 0,381	97,50±1,87	97,07±5,44	<sup>b</sup> 0,503

\*p<0,05, <sup>b</sup>Mann-Whitney.

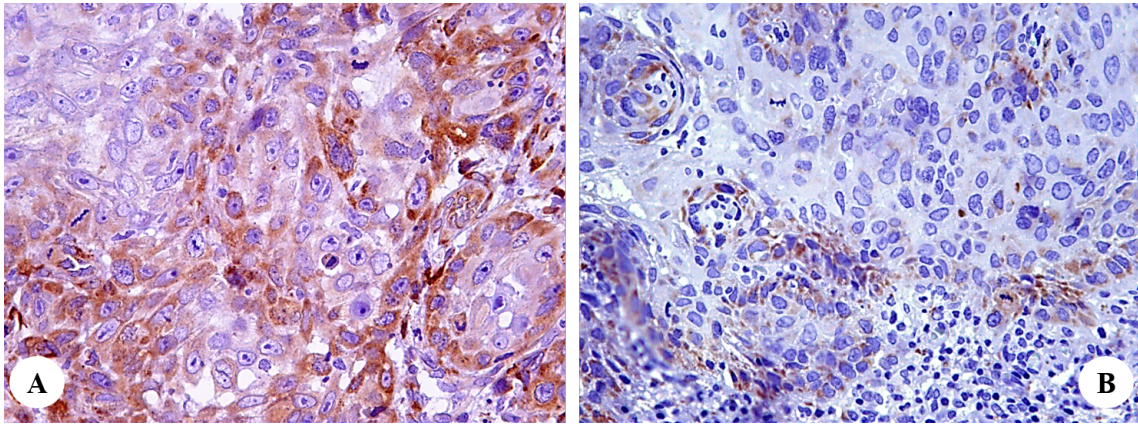
Dados expressos em forma de média e desvio-padrão.

DEO: Displasia epitelial oral; CEO: Carcinoma epidermoide oral.

## Figuras



**Figura 3.2.1:** Imunoexpressão de PTEN em DEO, CEO e mucosa normal. Imunomarcção homogênea observada na amostra de mucosa normal e uma imunomarcção heterogênea em CEO e DEO. (A) Mucosa normal onde observa-se muitas células com forte imunomarcção citoplasmática. (B) CEO mostrando imunomarcção nuclear extensa associada a forte imunomarcção citoplasmática na periferia da ilha tumoral. (C) CEO exibindo imunomarcção nuclear ausente associada (seta vermelha) a forte imunomarcção citoplasmática (seta preta). (D) DEO com imunomarcção nuclear ausente e imunomarcção citoplasmática fraca. (E) DEO apresentando imunomarcção nuclear localizada e imunomarcção citoplasmática forte (seta preta). (F) Controle positivo com imunomarcção moderada. (Anti-PTEN, 400x LSAB).



**Figura 3.2.2:** Áreas de imunocoloração heterogênea de PTEN em CEO (A / 400x LSAB) e DEO (B / 400x LSAB).

#### 4 DISCUSSÃO GERAL

Este estudo imunomolecular buscou traçar um paralelo entre o processo de malignização de diferentes estágios de lesões potencialmente malignas orais e CEOs por meio da via de sinalização PI3K/AKT. O presente estudo também realizou o estudo imunomolecular do *PTEN*, um supressor tumoral que atua na regulação dessa via, por meio da análise de LOH em duas regiões cromossômicas de *PTEN* (intergênica e intragênica) a fim de avaliar se a LOH desse gene se mostra envolvida na expressão proteica em diferentes estádios histológicos de DEOs e CEOs. Poucos estudos abordam a associação de lesões potencialmente malignas orais com desregulação dessa via.

Na análise de LOH de *PTEN*, o presente estudo sugere que o marcador intragênico possa não representar um marcador de progressão de malignidade, visto que foi constatado que a perda de um alelo de *PTEN* não parece ser suficiente para promover o crescimento tumoral, visto que a LOH entre DEOs e CEOs para o marcador AFMA086WG9R não variou entre esses grupos ( $p = 0,492$ ). No entanto, para o marcador intergênico, foi observado uma maior instabilidade microssatélite, resultando em múltiplas mudanças genéticas de genes no interior e próximo a *locus* D10S1765R, bem como de *PTEN*, justificando a instabilidade genética e a susceptibilidade a mutações nessa região, corroborando com estudos em hepatocarcinomas (BAE *et al.*, 2007), carcinoma de mama (TOKUNAGA *et al.*, 2007) e adenocarcinoma de células claras de ovário (HO *et al.*, 2009).

Quanto à imunomarcção de *PTEN*, foi observado que em CEOs ocorreu um aumento significativo da imunomarcção citoplasmática de *PTEN* em relação às displasias e controle, sugerindo possivelmente que o acúmulo da proteína *PTEN* pode decorrer de alterações genéticas desse gene. Outro fato que pode explicar elevada imunomarcção citoplasmática de *PTEN* nas amostras de CEOs deste estudo são as modificações translacionais que *PTEN* pode sofrer depois da sua transcrição gênica (HOPKINS *et al.*, 2013; HODOKOSKI *et al.* 2015) e a heterogeneidade tumoral (HUHNS *et al.*, 2014). O presente estudo pressupõe que a presença nuclear desse imunomarcador parece ter papéis distintos quando em CEOs e DEOs. Entretanto, a imunoexpressão nuclear de *PTEN* nas amostras de CEOs desta pesquisa não necessariamente apontam para um papel antitumoral efetivo dessa proteína nesta localização celular.

O *PTEN* tem sido demonstrado expresso em outros compartimentos celulares como o núcleo (LIU *et al.*, 2007; WANG, HUANG e YOUNG, 2015), nucléolo (LI *et al.*, 2014), mitocôndria e retículo endoplasmático (BONONI *et al.*, 2013). Assim, esta pesquisa realizou a



análise imunistoquímica detalhada da localização intracelular de PTEN associada ou não a LOH, uma vez que isto pode afetar significativamente seu comportamento celular (LI et al., 2014; HODAKOSKI et al., 2015). Foi demonstrado que a localização da expressão da proteína PTEN, bem como a intensidade de sua imunomarcção citoplasmática parece não estar envolvida com a retenção ou perda alélica intragênica de *PTEN* nos casos de DEOs e CEO. No entanto, para o marcador D10S1765R, a presente pesquisa observou uma presença significativa de PTEN nuclear nas amostras de CEOs com LOH, sugerindo que a perda alélica pode afetar o padrão de imunolocalização celular dessa proteína nas amostras de CEOs analisadas, no entanto, como anteriormente discutido, a função de PTEN nuclear deve ser melhor esclarecida por outros métodos de estudos, uma vez que diversos fatores podem alterar sua função primordial nessa sublocalização celular.

A localização nuclear de PTEN tem sido relacionada à inibição do crescimento celular (GIN-PEASE e ENG, 2007; LIU et al., 2007) e manutenção da estabilidade cromossômica da célula (WANG, HUANG, YOUNG; 2015). Uma vez no núcleo, PTEN exerce atividade supressora tumoral por mecanismos desconhecidos (LIU et al., 2007). É conhecido que outros marcadores celulares da via PI3K/AKT também se mostram presentes no núcleo celular, como PI3K (METJIAN et al., 1999) e AKT (WANG, HUANG, YOUNG; 2015), onde promove um efeito antiapoptótico de PTEN e interferirá na atividade supressora de crescimento celular de PTEN nuclear.

O presente estudo observou que a imunexpressão de pAKT membranar foi proporcional ao grau de malignização da lesão, nos dando base para supor que o processo de malignização das lesões orais, assim como no câncer oral, envolve o processo de ativação de AKT1, corroborando com estudos os quais sugerem que a localização membranar de AKT é pré-requisito para a oncogenicidade (CARPTEN et al., 2007). O presente estudo também observou uma imunomarcção nuclear significativamente maior nos CEOs do que nas DEOs e no controle, mostrando um efeito promotor tumoral maior nas lesões com a malignidade já instaurada. Corrobora para essa observação, o fato de que foi observado no presente estudo uma maior imunomarcção nuclear de PTEN em CEO em relação a DEO e controle, esse aumento da expressão de PTEN pode ser entendido como uma tentativa de controle da expressão aumentada de AKT (WATANABE et al., 2009; CHAVES et al., 2017), sugerindo que apesar da elevada imunexpressão de PTEN em CEO, sugerindo que sua ação/função possa estar comprometida, perdendo a sua propriedade supressora tumoral.

Os níveis mais baixos da imunexpressão de pAKT no citoplasma e membrana em CEOs podem contribuir para autofagia, que tem sido implicada tanto na supressão tumoral, bem

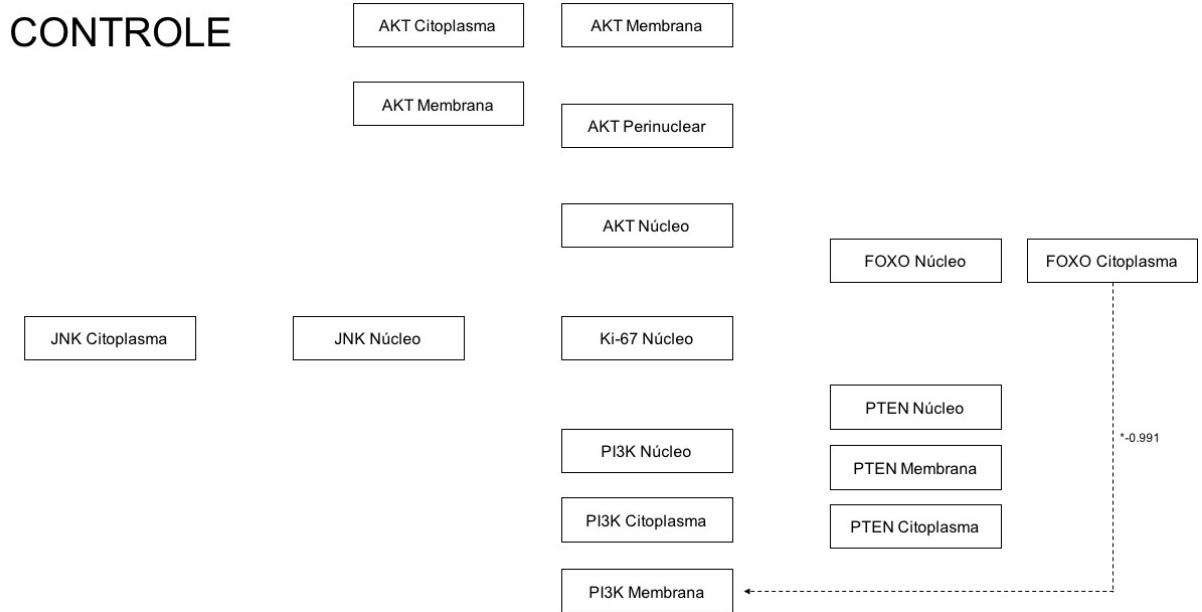
como na promoção do crescimento tumoral ((TAKAMURA et al., 2011). A ativação do AKT na membrana plasmática analisada inibe a indução de autofagia e a translocação de AKT do citossol para os lisossomas induz a autofagia (NOGUCHI et al, 2014; MATSUDA-LENNIKOV et al, 2014). Por isso que uma maior imunocoloração perinuclear de pAKT em DEOs de baixo risco, quando comparada com CEO, pode indicar envolvimento de autofagolisossomos na inibição da via PI3K-AKT nos estágios iniciais da progressão da malignidade.

O presente estudo também observou uma intensa imunomarcção nuclear pJNK predominantemente nos controles quando comparado às displasias e CEOs, mostrando que sua localização celular no núcleo está associada à função supressora tumoral, nesta amostra. Destaca-se que a função supressora tumoral de pJNK nuclear também se confirma ao se categorizar as displasias, entretanto, essa ação anti-tumoral se encontra comprometida independente do grau de malignidade do tumor. Interessantemente, a expressão de JNK parece se perder com a malignização da lesão, uma vez que há maior imunomarcção nuclear forte nas displasias de baixo grau quando comparado àquelas de alto grau, com diferença estatisticamente significativa. Estes achados sugerem que a menor expressão nuclear de pJNK nesta amostra está relacionada à regulação da tumorigênese, sugerindo um papel promotor de pJNK. O presente estudo acredita que o processo de malignização das displasias pode envolver os mesmos mecanismos das lesões malignas estabelecidas, uma vez que a intensidade de marcação nuclear de pJNK nas displasias obedece aos mesmos padrões dos CEOs e há uma maior imunomarcção nuclear forte nas displasias leves comparadas com as severas.

O presente estudo, por meio da imunomarcção de FoxO3a, corrobora que a perda da função supressora tumoral de *FoxO* pode estar relacionada à carcinogênese oral. No entanto, ao se categorizar as variáveis CEOs, de acordo com a gradação histopatológica, não se observou diferenças entre os grupos, evidenciando que, independente da gradação do tumor, a perda nuclear de FoxO contribui igualmente para o processo de carcinogênese oral. O presente trabalho também sugere que a inativação de FoxO3a nas DEOs, isto é, em lesões de estágio inicial de malignidade, contribuem de alguma forma para o seu processo de malignização. Corroborando para isso, é evidenciado que, nos estágios iniciais do tumor, a inativação de FoxO3a proporciona vantagens proliferativas às células neoplásicas por aumentar a sinalização por meio de fatores de crescimento, enquanto que nos estágios tardios do tumor, condições de estresse (hipóxia e estresse oxidativo) podem reativar FoxO3a e, assim, aumentar a sobrevivência das células tumorais (LI et al., 2012; YU et al., 2016).

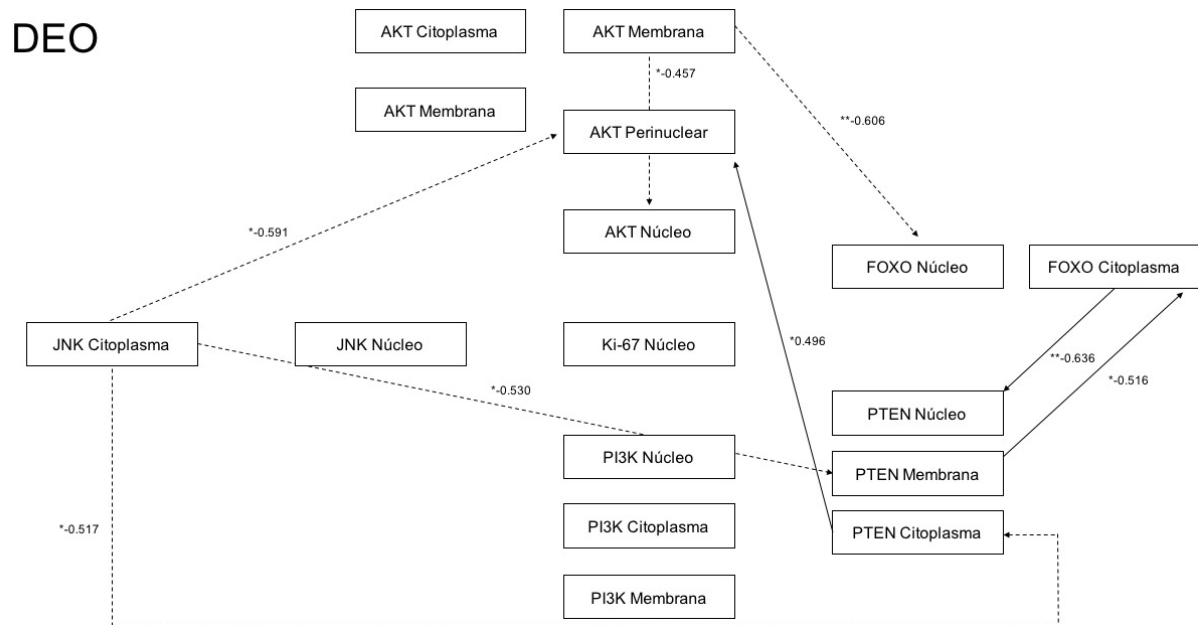
Foi estabelecido correlações entre os padrões de imunomarcção de pAKT, pJNK, FoxO3a,

PIK3CA, Ki-67 e PTEN em displasias, carcinomas epiteliais orais e epitélio normal como controle.



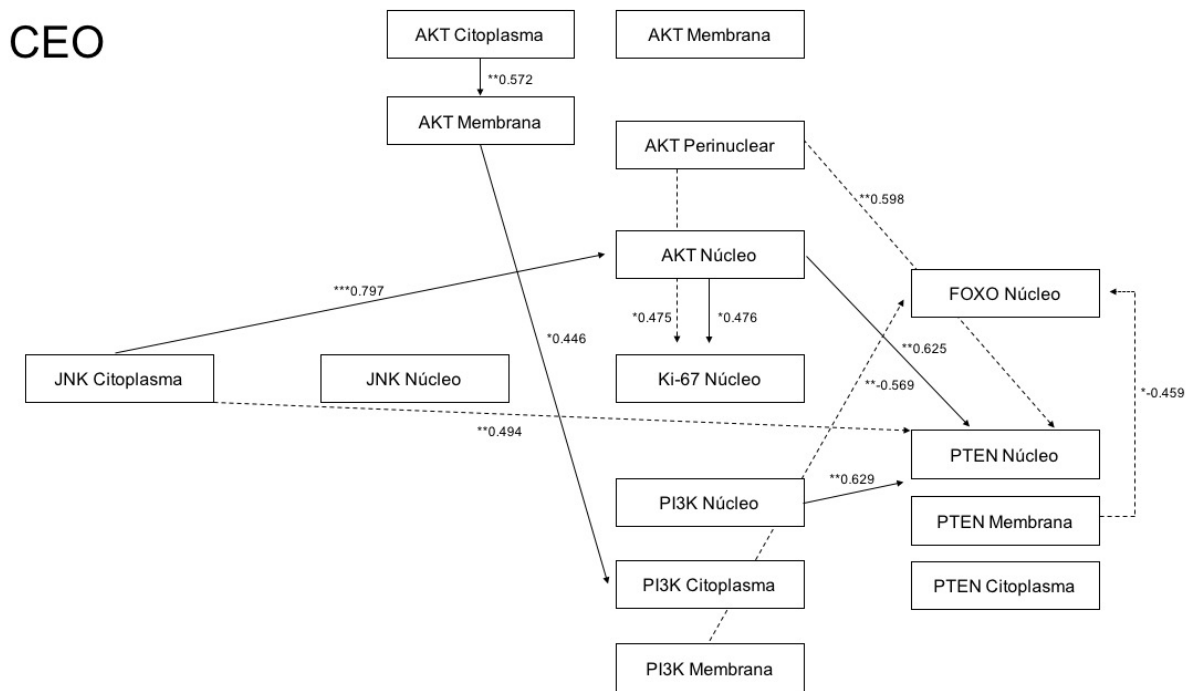
**Figura 4.1:** Análise de covariância entre a imunomarcção de pAKT, pJNK, FoxO3a, Ki-67 e PTEN no controle. \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P< 0.001.

Fonte: Própria



**Figura 4.2:** Análise de covariância entre a imunomarcção de pAKT, pJNK, FoxO3a, Ki-67 e PTEN em displasias epiteliais orais (DEO). \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P< 0.001.

Fonte: Própria



**Figura 4.3:** Análise de covariância entre a imunomarcagem de pAKT, pJNK, FoxO3a, Ki-67 e PTEN em carcinomas epidermóides orais (CEO). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

Fonte: Própria

Conforme mostra a Figura 4.1, observa-se no controle uma fraca correlação inversa entre a presença de PI3K membranar e FoxO3a citoplasmático.

Na Figura 4.2, em DEO, foi encontrado uma correlação inversa entre PTEN membranar e FoxO3a citoplasmático. Já a imunomarcagem de PTEN em citoplasma foi correlacionado diretamente com AKT perinuclear e inversamente proporcional a imunomarcagem citoplasmática de JNK. Estudos tem mostrado uma expressão aberrante da proteína JNK em células malignas (HUI et al., 2008; CHANG et al., 2009a; CHANG et al., 2009b; BARBARULO et al., 2013), sugerindo que JNK pode contribuir para a transformação celular requerida para a carcinogênese (BUBICE e PAPA, 2013), uma vez que a depleção individual dos diversos subtipos de JNKs pode suprimir a atividade tumoral, dependendo da especificidade no tecido (WAGNER e NEBREDA, 2009). O papel pró-tumoral de JNK, em diversos tipos de câncer, faz aumentar pesquisas que tem como alvo terapêutico esta proteína, porém a inibição de JNK pode ser também prejudicial (BUBICE e PAPA, 2013) uma vez que substanciais evidências implicam JNK como supressor tumoral (WAGNER e NEBREDA, 2009). Uma possível explicação para o papel pró-tumoral e antitumoral de JNK é a regulação de diversos alvos celulares específicos em diferentes tipos de câncer, ainda que muitas dessas proteínas alvo permaneçam ainda desconhecidas (BUBICE e PAPA, 2013). Para Du et al (2004) outras variáveis que interferem no nível de complexidade da regulação de JNK na tumorigênese são o

estímulo para ativação, a duração de ativação e o contexto de sua produção.

Ainda na Figura 4.2, observa-se que em DEOs uma fraca correlação inversa entre a presença de AKT membranar e AKT nuclear. Justificado pela translocação nuclear de AKT que reduz seus níveis na membrana e no citoplasma, afetando a fosforilação de substratos nesses compartimentos celulares (DILLON e MULLER, 2010). A translocação nuclear também aumenta sua influência em alvos nucleares específicos, gerando, entre outras coisas, a progressão do ciclo celular e supressão da apoptose (MARTELLI et al, 2012). A presença de AKT nuclear é encontrada em vários tipos de câncer (LEE et al, 2002; NICHOLSON et al, 2003; VASKO et al, 2004; GIUDICE et al, 2011), e, no presente estudo, observa-se que AKT nuclear em lesões potencialmente malignas, sugerindo que o AKT nuclear possa estar envolvido no processo de transformação maligna.

Nas DEOs, a localização citoplasmática de JNK apresentou moderada correlação inversa com AKT perinuclear, momento no qual foi sugerido pelo presente estudo que o processo de autofagia celular, indicado pela presença de AKT perinuclear possa estar relacionada com a redução do JNK citoplasmático (MATSUDA-LENNIKOV et al, 2014; NOGUCHI et al, 2014). AKT membranar foi inversamente correlacionado com a presença de FoxO3a nuclear, uma vez que a fosforilação e posterior ativação de AKT resulta no sequestro de FoxO no citoplasma (VAN DER HEIDE et al, 2004). Assim, como visto no presente trabalho, a perda de FoxO3a nuclear e com seu posterior deslocamento para o citoplasma, mostra um processo envolvido na transformação maligna do DEO.

Em CEO, encontra-se, na Figura 4.3, uma direta relação de imunomarcção nuclear de PTEN com AKT perinuclear e nuclear, além de JNK citoplasmático. Já na imunomarcção de PI3K, observa-se uma correlação direta de PI3K citoplasmático com AKT membranar, entretanto, uma imunomarcção membranar de PI3K esteve inversamente relacionado à imunomarcção nuclear de FoxO.

Quanto à marcação imunoistoquímica de PI3K, a presença nuclear de PIK3CA em CEO mostrou haver associação indireta com as DEOs, sugerindo que a presença nuclear desse imunomarcador parece ter papéis distintos quando em CEOs e DEOs. No entanto, a presença nuclear desse imunomarcador parece não influenciar no grau de malignidade das DEOs e CEOs, uma vez que, ao se categorizar estas variáveis, não se observou uma diferença estatisticamente significativa. Foi observado que o processo de saída de PIK3CA no citoplasma, de acordo com a proliferação neoplásica, está relacionada ao seu papel pró-tumoral, no qual o PIK3CA sai do citoplasma e fica na membrana, parece estar envolvido nas DEOs de forma semelhante ao carcinoma. Ainda na Figura 4.3, em CEO, a presença de AKT citoplasmática foi diretamente

correlacionada com AKT membranar, corroborando com a literatura, uma vez que a ativação do AKT inicia na membrana e realiza suas diversas funções no citoplasma, onde se dirige a diversos substratos (NICHOLSON e ANDERSON, 2002; GONZALEZ e McGRAW, 2009; DILLON e MULLER, 2010). Curiosamente, não foi observado essa associação em amostras de DEO (Figura 4.2), o que nos leva a sugerir que a ativação de AKT nessas lesões poderia ocorrer por meio de um mecanismo que não envolve o modo clássico de ativação de AKT; isto é, através da sua ativação prévia na membrana.

A imunomarcagem nuclear de AKT demonstrou uma forte correlação direta com o JNK citoplasmático (Figura 4.3). Essa associação entre JNK e AKT parece envolver FoxO3a. Sugere-se que a atividade AKT aumentada pode levar à supressão da atividade apoptótica de JNK (KIM et al, 2001; FEY et al, 2012), permitindo que sua atividade seja apenas proliferativa (FEY et al, 2012). Acredita-se que o AKT nuclear pode estar fortemente envolvido na saída de JNK para o citoplasma, impedindo que ele atue sobre fatores de transcrição nuclear que possam ter papel supressor de tumor.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

No presente estudo, por meio da análise imunoistoquímica da via PI3K/AKT, é sugerido que o processo de transformação maligna das DEOs pode envolver os mesmos mecanismos de lesões malignas estabelecidas. Também foi observado que a localização celular das proteínas investigadas tem um papel direto nas suas funções no microambiente tumoral, especialmente para a atividade antitumoral de p-JNK e FoxO3a. Conclui-se também que a autofagia celular tem um papel pró-tumorigênico, com base em uma correlação direta entre autofagia e proliferação celular em CEOs.

Com relação ao gene supressor tumoral *PTEN*, foi fornecido evidência que a perda alélica de *PTEN* esteve presente nos casos de DPM orais e CEOs avaliados, no entanto, a LOH de *PTEN* parece não influenciar na sua expressão proteica. Além disso, é encontrado a presença de heterogeneidade na expressão proteica de *PTEN* nas amostras avaliadas de DEOs e CEOs, independente da sua diferenciação histopatológica. Estudos moleculares buscando avaliar áreas homogêneas de *PTEN* poderão contribuir para um melhor entendimento do processo de transformação maligna das DEOs.

## REFERÊNCIAS

ABDULLAH, J. M. et al. Association of loss of heterozygosity and PTEN gene abnormalities with paraclinical, clinical modalities and survival time of glioma patients in Malaysia. **Asian J Surg**, v. 29, n. 4, p. 274-82, Oct 2006. ISSN 1015-9584 (Print)1015-9584. Disponível em: &lt; [http://dx.doi.org/10.1016/s1015-9584\(09\)60102-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1015-9584(09)60102-0) &gt;.

ABOU-ELHAMD, K. E. et al. The role of genetic susceptibility in head and neck squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 265, n. 2, p. 217-22, Feb 2008. ISSN 0937-4477 (Print)0937-4477. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-007-0436-4> &gt;.

ACCURSO, B. T. et al. Allelic imbalance in oral lichen planus and assessment of its classification as a premalignant condition. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 112, n. 3, p. 359-66, Sep 2011. ISSN 1079-2104. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.03.042> &gt;.

AHMED, H. G.; IDRIS, A. M.; IBRAHIM, S. O. Study of oral epithelial atypia among Sudanese tobacco users by exfoliative cytology. **Anticancer Res**, v. 23, n. 2c, p. 1943-9, Mar-Apr 2003. ISSN 0250-7005 (Print)0250-7005. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

ALYASIRI, N. S. et al. PTEN-mediated AKT activation contributes to the reduced apoptosis among Indian oral squamous cell carcinoma patients. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 138, n. 1, p. 103-9, Jan 2012. ISSN 0171-5216. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-011-1077-y> &gt;.

ANGADI, P. V.; KRISHNAPILLAI, R. Evaluation of PTEN immunoeexpression in oral submucous fibrosis: role in pathogenesis and malignant transformation. **Head Neck Pathol**, v. 6, n. 3, p. 314-21, Sep 2012. ISSN 1936-055x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1007/s12105-012-0341-z> &gt;.

ASHAZILA, M. J. et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in oral squamous cell carcinoma in Malaysian population. **Oral Oncol**, v. 47, n. 5, p. 358-64, May 2011. ISSN 1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.03.005> &gt;.

AYALA, F. R. et al. GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2374-87, Apr 01 2010. ISSN 1420-3049. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.3390/molecules15042374> &gt;.



BAE, J. J. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10q23 and mutation of the phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 tumor suppressor gene in Korean hepatocellular carcinoma patients. **Oncol Rep**, v. 18, n. 4, p. 1007-13, Oct 2007. ISSN 1021-335X (Print)1021-335x. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/> &gt;.

BARBARULO, A. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase family member 14 (PARP14) is a novel effector of the JNK2-dependent pro-survival signal in multiple myeloma. **Oncogene**, v. 32, n. 36, p. 4231-42, Sep 05 2013. ISSN 0950-9232. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.448> &gt;.

BARNES, L. et al. **World Health Organization classification of tumours**. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC, Lyon. 2005.

BERGER, A. H.; KNUDSON, A. G.; PANDOLFI, P. P. A continuum model for tumour suppression. **Nature**, v. 476, n. 7359, p. 163-9, Aug 10 2011. ISSN 0028-0836. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1038/nature10275> &gt;.

BERMAN, H. K.; GAUTHIER, M. L.; TLSTY, T. D. Premalignant breast neoplasia: a paradigm of interlesional and intralesional molecular heterogeneity and its biological and clinical ramifications. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 3, n. 5, p. 579-87, May 2010. ISSN 1940-6215. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.capr-10-0073> &gt;.

BETTENDORF, O. et al. Chromosomal imbalances, loss of heterozygosity, and immunohistochemical expression of TP53, RB1, and PTEN in intraductal cancer, intraepithelial neoplasia, and invasive adenocarcinoma of the prostate. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 47, n. 7, p. 565-72, Jul 2008. ISSN 1045-2257. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1002/gcc.20560> &gt;.

BIRAJDAR, S. S. et al. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 18, n. 2, p. 169-76, May 2014. ISSN 0973-029X (Print)0973-029x. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.4103/0973-029x.140729> &gt;.

BODE, A. M.; DONG, Z. The functional contrariety of JNK. **Mol Carcinog**, v. 46, n. 8, p. 591-8, Aug 2007. ISSN 0899-1987 (Print)0899-1987. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1002/mc.20348> &gt;.

BOLAND, C. R. et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 58, n. 22, p. 5248-57, Nov 15 1998. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/> &gt;.

BOLAND, C. R.; GOEL, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2073-2087.e3, Jun 2010. ISSN 0016-5085. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064> &gt;.

BONONI, A. et al. Identification of PTEN at the ER and MAMs and its regulation of Ca(2+) signaling and apoptosis in a protein phosphatase-dependent manner. **Cell Death Differ**, v. 20, n. 12, p. 1631-43, Dec 2013. ISSN 1350-9047. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2013.77> &gt;.

BREMMER, J. F. et al. Comparative evaluation of genetic assays to identify oral pre-cancerous fields. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 10, p. 599-606, Nov 2008. ISSN 0904-2512. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2008.00682.x> &gt;.

BRENNAN, M. et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 103 Suppl, p. S19.e1-12, Mar 2007. ISSN 1079-2104. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.10.015> &gt;.

BUBICI, C.; PAPA, S. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 1, p. 24-37, Jan 2014. ISSN 0007-1188. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1111/bph.12432> &gt;.

CALDEIRA, P. C.; ABREU, M. H.; DO CARMO, M. A. Binary system of grading oral epithelial dysplasia: evidence of a bearing to the scores of an immunohistochemical study. **J Oral Pathol Med**, v. 41, n. 6, p. 452-3, Jul 2012. ISSN 0904-2512. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2012.01128.x> &gt;.

CALNAN, D. R.; BRUNET, A. The FoxO code. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2276-88, Apr 07 2008. ISSN 0950-9232. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.21> &gt;.

CAMARA, P. R. et al. A comparative study using WHO and binary oral epithelial dysplasia grading systems in actinic cheilitis. **Oral Dis**, v. 22, n. 6, p. 523-9, Sep 2016. ISSN 1354-523x. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1111/odi.12484> &gt;.

CARPENTER, W. M.; SILVERMAN, S., JR. Oral cancer: the role of the dentist in prevention and early detection. **Dent Today**, v. 20, n. 5, p. 92-7, May 2001. ISSN 8750-2186 (Print)8750-2186. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/> &gt;.

CARPEN, J. D. et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 439-44, Jul 26 2007. ISSN 0028-0836. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1038/nature05933> &gt;.

CARRARD, V. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. **Oral Dis**, v. 17, n. 2, p. 171-9, Mar 2011. ISSN 1354-523x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01712.x> &gt;.

CAVENEY, W. K. Genetic driver events in premalignancy: LOH validated for marking the risk of oral cancer. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 5, n. 9, p. 1073-4, Sep 2012. ISSN 1940-6215. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.capr-12-0220> &gt;.

CHAKRABORTY, S. et al. Involvement of TSC genes and differential expression of other members of the mTOR signaling pathway in oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 8, p. 163, Jun 06 2008. ISSN 1471-2407. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-8-163> &gt;.

CHANG, C. J. et al. PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 10, p. 3281-9, May 2008. ISSN 0270-7306. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.00310-08> &gt;.

CHANG, Q. et al. Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer. **J Hepatol**, v. 50, n. 2, p. 323-33, Feb 2009. ISSN 0168-8278 (Print)0168-8278. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2008.07.037> &gt;.

CHANG, Y.; WU, X. Y. The role of c-Jun N-terminal kinases 1/2 in transforming growth factor beta(1)-induced expression of connective tissue growth factor and scar formation in the cornea. **J Int Med Res**, v. 37, n. 3, p. 727-36, May-Jun 2009. ISSN 0300-0605 (Print)0300-0605. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1177/147323000903700316> &gt;.

CHAVES, F. N. et al. Evaluation of the p-AKT, p-JNK and FoxO3a function in oral epithelial dysplasia. **Oral Dis**, v. 23, n. 3, p. 367-378, Apr 2017. ISSN 1354-523x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/odi.12623> &gt;.

CHEN, Q. et al. Homozygous deletion of the PTEN tumor-suppressor gene is not a feature in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 36, n. 1, p. 95-9, Jan 2000. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

CHEN, Y. J. et al. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. **Cancer Sci**, v. 99, n. 8, p. 1507-14, Aug 2008. ISSN 1347-9032. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00863.x> &gt;.

CHENG, J.Q. *et al.* Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.93, n.8, p.3636-3641, 1996.

CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 5, p. 401-21, Sep-Oct 2015. ISSN 0007-9235. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21293> &gt;.

CHOI, B. Y. *et al.* The tumor suppressor p16(INK4a) prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. **Nat Struct Mol Biol**, v. 12, n. 8, p. 699-707, Aug 2005. ISSN 1545-9993 (Print)1545-9985. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb960> &gt;.

CHOI, Y. *et al.* c-Jun N-terminal kinase activation has a prognostic implication and is negatively associated with FOXO1 activation in gastric cancer. **BMC Gastroenterol**, v. 16, n. 1, p. 59, Jun 06 2016. ISSN 1471-230x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1186/s12876-016-0473-9> &gt;.

CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **J Dent Res**, v. 87, n. 1, p. 14-32, Jan 2008. ISSN 0022-0345 (Print)0022-0345. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1177/154405910808700104> &gt;.

CLAUDITZ, T. S. *et al.* Abundant expression of mTOR kinase in salivary gland tumors - potentials as therapy target? **J Oral Pathol Med**, v. 42, n. 10, p. 769-73, Nov 2013. ISSN 0904-2512. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/jop.12064> &gt;.

COHEN, Y. *et al.* Mutational analysis of PTEN/PIK3CA/AKT pathway in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 47, n. 10, p. 946-50, Oct 2011. ISSN 1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.07.013> &gt;.

COLLIN-CHAVAGNAC, D. *et al.* Quantitative loss of heterozygosity analysis for urothelial carcinoma detection and prognosis. **Urology**, v. 76, n. 2, p. 515.e1-7, Aug 2010. ISSN 0090-4295. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.urology.2009.11.046> &gt;.

CORREA, G. T. *et al.* Lip cancer and pre-cancerous lesions harbor TP53 mutations, exhibit allelic loss at 9p, 9q, and 17p, but no BRAFV600E mutations. **Tumour Biol**, v. 36, n. 11, p. 9059-66, Nov 2015. ISSN 1010-4283. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-3659-9> &gt;.

COURTNEY, K. D.; CORCORAN, R. B.; ENGELMAN, J. A. The PI3K pathway as drug target in human cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 6, p. 1075-83, Feb 20 2010. ISSN 0732-183x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2009.25.3641> &gt;.

COUTO, S. S. The pathologist's slide reveals more than meets the eye: loss of heterozygosity and cancer biology. **Vet Pathol**, v. 48, n. 1, p. 236-44, Jan 2011. ISSN 0300-9858. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1177/0300985810379432> &gt;.

CUEVAS GONZALEZ, J. C. et al. p53 and p16 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A study of 208 cases. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 59, n. 2, p. 153-8, Apr-Jun 2016. ISSN 0377-4929. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.4103/0377-4929.182037> &gt;.

DAHIA, P. L. PTEN, a unique tumor suppressor gene. **Endocr Relat Cancer**, v. 7, n. 2, p. 115-29, Jun 2000. ISSN 1351-0088 (Print)1351-0088. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

DANTAS, T. S. et al. Influence of Educational Level, Stage, and Histological Type on Survival of Oral Cancer in a Brazilian Population: A Retrospective Study of 10 Years Observation. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 3, p. e2314, Jan 2016. ISSN 0025-7974. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1097/md.0000000000002314> &gt;.

DAVIS, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 239-52, Oct 13 2000. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

DEGTYAREV, M. et al. Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. **J Cell Biol**, v. 183, n. 1, p. 101-16, Oct 06 2008. ISSN 0021-9525. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200801099> &gt;.

DILLON, R. L.; MULLER, W. J. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. **Cancer Res**, v. 70, n. 11, p. 4260-4, Jun 01 2010. ISSN 0008-5472. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-10-0266> &gt;.

DIWAKAR, N. et al. Heterogeneity, histological features and DNA ploidy in oral carcinoma by image-based analysis. **Oral Oncol**, v. 41, n. 4, p. 416-22, Apr 2005. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2004.10.009> &gt;.

DU, L. et al. Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity: evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. **J Biol Chem**, v. 279, n. 12, p. 11957-66, Mar 19 2004a. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M304935200> &gt;.

DUFNER, A. et al. Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 6, p. 4525-34, Jun 1999. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

ECKERT, A. W. et al. Coexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. **Histopathology**, v. 58, n. 7, p. 1136-47, Jun 2011. ISSN 0309-0167. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03806.x> &gt;.

EL-NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K. C; GRANDIS, J. R.; TAKATA, T.; SLOOTWEG, P. J. WHO Classification of Head and Neck Tumours (4th edition). IARC: Lyon 2017.

ENGELMAN, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 8, p. 550-62, Aug 2009. ISSN 1474-175x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2664> &gt;.

EVERSOLE, L. R. Dysplasia of the upper aerodigestive tract squamous epithelium. **Head Neck Pathol**, v. 3, n. 1, p. 63-8, Mar 2009. ISSN 1936-055x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1007/s12105-009-0103-8> &gt;.

FAIVRE, S.; KROEMER, G.; RAYMOND, E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. In: (Ed.). **Nat Rev Drug Discov**. England, v.5, 2006. p.671-88. ISBN 1474-1776 (Print)1474-1776 (Linking).

FARIAS, L. C. et al. Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. **Hum Pathol**, v. 43, n. 8, p. 1229-33, Aug 2012. ISSN 0046-8177. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2011.08.026> &gt;.

FEY, D. et al. Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. **Front Physiol**, v. 3, p. 355, 2012. ISSN 1664-042x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2012.00355> &gt;.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 01 2015. ISSN 0020-7136. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.29210> &gt;.

FIELD, J. K. et al. Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. **Br J Cancer**, v. 72, n. 5, p. 1180-8, Nov 1995. ISSN 0007-0920 (Print)0007-0920. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

FILLIES, T. et al. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. **BMC Cancer**, v. 5, p. 84, Jul 21 2005. ISSN 1471-2407. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-5-84> &gt;.

FINGAR, D. C. et al. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 1, p. 200-16, Jan 2004. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

FONSECA-SILVA, T. et al. Association between histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia and loss of heterozygosity. **Histopathology**, v. 68, n. 3, p. 456-60, Feb 2016. ISSN 0309-0167. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/his.12746> &gt;.

FRESNO VARA, J. A. et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer Treat Rev**, v. 30, n. 2, p. 193-204, Apr 2004a. ISSN 0305-7372 (Print)0305-7372. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.007> &gt;.

GALE, N. et al. Evaluation of a new grading system for laryngeal squamous intraepithelial lesions--a proposed unified classification. **Histopathology**, v. 65, n. 4, p. 456-64, Oct 2014. ISSN 0309-0167. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/his.12427> &gt;.

GAROFALO, R. S. et al. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. **J Clin Invest**, v. 112, n. 2, p. 197-208, Jul 2003. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1172/jci16885> &gt;.

GINN-PEASE, M. E.; ENG, C. Increased nuclear phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 is associated with G0-G1 in MCF-7 cells. **Cancer Res**, v. 63, n. 2, p. 282-6, Jan 15 2003. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

GIUDICE, F. S. et al. Different expression patterns of pAkt, NF-kappaB and cyclin D1 proteins during the invasion process of head and neck squamous cell carcinoma: an in vitro approach. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 5, p. 405-11, May 2011. ISSN 0904-2512. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00960.x> &gt;.

GIUDICE, F. S.; SQUARIZE, C. H. The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. **J Carcinog Mutagen**, v. Suppl 5, Aug 02 2013. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.4172/2157-2518.s5-003> &gt;.

GLAVAC, D. et al. Low microsatellite instability and high loss of heterozygosity rates indicate dominant role of the suppressor pathway in squamous cell carcinoma of head and neck and loss of heterozygosity of 11q14.3 correlates with tumor grade. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 146, n. 1, p. 27-32, Oct 01 2003. ISSN 0165-4608 (Print)0165-4608. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

GOMES, C. C. et al. Inter- and intra-lesional molecular heterogeneity of oral leukoplakia. **Oral Oncol**, v. 51, n. 2, p. 178-81, Feb 2015. ISSN 1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.11.003> &gt;.

GONZALES-MOLES, M. A. et al. p16 Expression in squamous carcinomas of the tongue. **Onkologie**, v. 25, n. 5, p. 433-6, Oct 2002. ISSN 0378-584X (Print)0378-584x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/67437> &gt;.

GONZALEZ, E.; MCGRAW, T. E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. **Cell Cycle**, v. 8, n. 16, p. 2502-8, Aug 15 2009. ISSN 1551-4005. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.16.9335> &gt;.

GOODSON, M. L. et al. Oral precursor lesions and malignant transformation--who, where, what, and when? **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 53, n. 9, p. 831-5, Nov 2015. ISSN 0266-4356. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2015.08.268> &gt;.

GOWDA, P. S. et al. p53 binding prevents phosphatase-mediated inactivation of diphosphorylated c-Jun N-terminal kinase. **J Biol Chem**, v. 287, n. 21, p. 17554-67, May 18 2012. ISSN 0021-9258. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.319277> &gt;.

GRAVELAND, A. P. et al. Molecular screening of oral precancer. **Oral Oncol**, v. 49, n. 12, p. 1129-35, Dec 2013. ISSN 1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.09.005> &gt;.

GREER, E. L.; BRUNET, A. FOXO transcription factors in ageing and cancer. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 192, n. 1, p. 19-28, Jan 2008. ISSN 1748-1708. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01780.x> &gt;.

GRIFFITH, C. C. et al. PIK3CA mutations and PTEN loss in salivary duct carcinomas. **Am J Surg Pathol**, v. 37, n. 8, p. 1201-7, Aug 2013. ISSN 0147-5185. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182880d5a> &gt;.



GUO, J. P.; COPPOLA, D.; CHENG, J. Q. IKBKE protein activates Akt independent of phosphatidylinositol 3-kinase/PDK1/mTORC2 and the pleckstrin homology domain to sustain malignant transformation. **J Biol Chem**, v. 286, n. 43, p. 37389-98, Oct 28 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.287433> &gt;.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 04 2011. ISSN 0092-8674. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> &gt;.

HASEGAWA, M. et al. Differential immunohistochemical expression profiles of perlecan-binding growth factors in epithelial dysplasia, carcinoma in situ, and squamous cell carcinoma of the oral mucosa. **Pathol Res Pract**, v. 212, n. 5, p. 426-36, May 2016. ISSN 0344-0338. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2016.02.016> &gt;.

HEGARTY, A. M.; HUNTER, K. D. Oral malignancy and premalignancy. **Br J Hosp Med (Lond)**, v. 77, n. 4, p. 232-9, Apr 2016. ISSN 1750-8460 (Print)1750-8460. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.12968/hmed.2016.77.4.232> &gt;.

HO, C. M. et al. PTEN promoter methylation and LOH of 10q22-23 locus in PTEN expression of ovarian clear cell adenocarcinomas. **Gynecol Oncol**, v. 112, n. 2, p. 307-13, Feb 2009. ISSN 0090-8258. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.09.040> &gt;.

HODAKOSKI, C. et al. Analysis of intracellular PTEN signaling and secretion. **Methods**, v. 77-78, p. 164-71, May 2015. ISSN 1046-2023. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.11.008> &gt;.

HOPKINS, B. D. et al. A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. **Science**, v. 341, n. 6144, p. 399-402, Jul 26 2013. ISSN 0036-8075. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1234907> &gt;.

HU, T. H. et al. Down-regulation of tumor suppressor gene PTEN, overexpression of p53, plus high proliferating cell nuclear antigen index predict poor patient outcome of hepatocellular carcinoma after resection. **Oncol Rep**, v. 18, n. 6, p. 1417-26, Dec 2007. ISSN 1021-335X (Print)1021-335x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

HUANG, H.; TINDALL, D. J. Dynamic FoxO transcription factors. **J Cell Sci**, v. 120, n. Pt 15, p. 2479-87, Aug 01 2007. ISSN 0021-9533 (Print)0021-9533. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.001222> &gt;.

HUBER, M.A. White oral lesions, actinic cheilitis, and leukoplakia: confusions in terminology and definition: Facts and controversies. **Clin Dermatol**, v. 28, n. 3, p. 262–8, May-Jun 2010. ISSN 0738-081x. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.06.011>&gt;.

HUHNS, M. et al. PTEN mutation, loss of heterozygosity, promoter methylation and expression in colorectal carcinoma: two hits on the gene? **Oncol Rep**, v. 31, n. 5, p. 2236–44, May 2014. ISSN 1021-335x. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.3892/or.2014.3097>&gt;.

HUI, L. et al. Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. **J Clin Invest**, v. 118, n. 12, p. 3943–53, Dec 2008. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1172/jci37156> &gt;.

IDOATE, M. A. et al. Biological and clinical significance of the intratumour heterogeneity of PTEN protein expression and the corresponding molecular abnormalities of the PTEN gene in glioblastomas. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 40, n. 6, p. 736–46, Oct 2014. ISSN 0305-1846. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1111/nan.12117> &gt;.

INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro : Inca, 2016.

JAMADAR, S. et al. Comparative study of various grading systems in oral squamous cell carcinoma and their value in predicting lymph node metastasis. **Indian J Dent Res**, v. 25, n. 3, p. 357–63, May-Jun 2014. ISSN 0970-9290. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.4103/0970-9290.138336> &gt;.

JEON, G. A. et al. Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines. **Int J Cancer**, v. 112, n. 2, p. 249–58, Nov 01 2004. ISSN 0020-7136 (Print)0020-7136. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.20399> &gt;.

JOUNG, S. M. et al. Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1. **J Immunol**, v. 186, n. 1, p. 499–507, Jan 01 2011. ISSN 0022-1767. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0903534> &gt;.

KALAVREZOS, N.; SCULLY, C. Mouth Cancer for Clinicians Part 6: Potentially Malignant Disorders. **Dent Update**, v. 42, n. 9, p. 866–8, 871–4, 877, Nov 2015. ISSN 0305-5000 (Print)0305-5000. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/> &gt;.

KIM, D. K. et al. Adaptive concentrations of hydrogen peroxide suppress cell death by blocking the activation of SAPK/JNK pathway. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 23, p. 4329-34, Dec 2001a. ISSN 0021-9533 (Print)0021-9533. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

KNUDSON, A. G., JR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 4, p. 820-3, Apr 1971. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

KOBAYASHI, T. et al. Histopathological varieties of oral carcinoma in situ: Diagnosis aided by immunohistochemistry dealing with the second basal cell layer as the proliferating center of oral mucosal epithelia. **Pathol Int**, v. 60, n. 3, p. 156-66, Mar 2010. ISSN 1320-5463. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1827.2009.02499.x> &gt;.

KRUSE-LOSLER, B. et al. Histologic, histomorphometric and immunohistologic changes of the gingival tissues immediately following mandibular osteodistraction. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 1, p. 98-103, Jan 2005. ISSN 0303-6979 (Print)0303-6979. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00636.x> &gt;.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**, v. 42, n. 10, p. 987-93, Nov 2006. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.12.014> &gt;.

KURASAWA, Y. et al. PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v. 19, n. 6, p. 1429-34, Jun 2008. ISSN 1021-335X (Print)1021-335x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

KURIBAYASHI, Y. et al. Long-term outcome of non-surgical treatment in patients with oral leukoplakia. **Oral Oncol**, v. 51, n. 11, p. 1020-5, Nov 2015. ISSN 1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.09.004> &gt;.

LAI, D.; VISSER-GRIEVE, S.; YANG, X. Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. **Biosci Rep**, v. 32, n. 4, p. 361-74, Aug 2012. ISSN 0144-8463. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20110125> &gt;.

LAM, E. W.; FRANCIS, R. E.; PETKOVIC, M. FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. Pt 5, p. 722-6, Nov 2006. ISSN 0300-5127 (Print)0300-5127. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1042/bst0340722> &gt;.

LEE, S. H. et al. Non-small cell lung cancers frequently express phosphorylated Akt; an immunohistochemical study. **Apmis**, v. 110, n. 7-8, p. 587-92, Aug 2002. ISSN 0903-4641 (Print)0903-4641. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

LEE, D. J. et al. Multiple tumor-suppressor genes on chromosome 3p contribute to head and neck squamous cell carcinoma tumorigenesis. **Cancer Biol Ther**, v. 10, n. 7, p. 689-93, Oct 01 2010. ISSN 1538-4047. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.10.7.12886> &gt;.

LEE, T. L. et al. Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin-6 receptor and epidermal growth factor receptor signaling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cell carcinomas. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 1, p. 8-19, Jan 2006. ISSN 1535-7163 (Print)1535-7163. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.mct-05-0069> &gt;.

LI, B. et al. Suppression of esophageal tumor growth and chemoresistance by directly targeting the PI3K/AKT pathway. **Oncotarget**, v. 5, n. 22, p. 11576-87, Nov 30 2014. ISSN 1949-2553. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.2596> &gt;.

LI, Y. C. et al. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Mol Biol Evol**, v. 21, n. 6, p. 991-1007, Jun 2004. ISSN 0737-4038 (Print)0737-4038. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msh073> &gt;.

LI, Z. et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protein activates nuclear factor kappaB through B-cell lymphoma/leukemia 10 (BCL10) protein and promotes tumor cell survival in serum deprivation. **J Biol Chem**, v. 287, n. 21, p. 17737-45, May 18 2012. ISSN 0021-9258. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.291708> &gt;.

LINGEN, M. W. et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. **Oral Dis**, v. 17 Suppl 1, p. 7-22, Apr 2011. ISSN 1354-523x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01789.x> &gt;.

LIPPMAN, S. M.; HONG, W. K. Molecular markers of the risk of oral cancer. **N Engl J Med**, v. 344, n. 17, p. 1323-6, Apr 26 2001. ISSN 0028-4793 (Print)0028-4793. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1056/nejm200104263441710> &gt;.

LIU, J. C. et al. Combined deletion of Pten and p53 in mammary epithelium accelerates triple-negative breast cancer with dependency on eEF2K. **EMBO Mol Med**, v. 6, n. 12, p. 1542-60, Dec 2014. ISSN 1757-4676. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201404402> &gt;.

LIU, J. L. et al. Cell cycle-dependent nuclear export of phosphatase and tensin homologue tumor suppressor is regulated by the phosphoinositide-3-kinase signaling cascade. **Cancer Res**, v. 67, n. 22, p. 11054-63, Nov 15 2007. ISSN 0008-5472. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-1263> &gt;.

LIU, W. et al. Oral cancer development in patients with leukoplakia--clinicopathological factors affecting outcome. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34773, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0034773> &gt;.

LU, X. X. et al. PTEN Inhibits Cell Proliferation, Promotes Cell Apoptosis, and Induces Cell Cycle Arrest via Downregulating the PI3K/AKT/hTERT Pathway in Lung Adenocarcinoma A549 Cells. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 2476842, 2016. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1155/2016/2476842> &gt;.

MADHUNAPANTULA, S. V.; ROBERTSON, G. P. The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 22, n. 4, p. 400-19, Aug 2009. ISSN 1755-1471 (Print)1755-1471. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00585.x> &gt;.

MAHAJAN, K. et al. Ack1 mediated AKT/PKB tyrosine 176 phosphorylation regulates its activation. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9646, Mar 19 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009646> &gt;.

MAHAJAN, K.; MAHAJAN, N. P. PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 9, p. 3178-84, Sep 2012. ISSN 0021-9541. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24065> &gt;.

MAO, L. et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. **Nat Med**, v. 2, n. 6, p. 682-5, Jun 1996. ISSN 1078-8956 (Print)1078-8956. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/> &gt;.

MARTELLI, A. M. et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 12, p. 2168-78, Dec 2012. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.08.017> &gt;.

MASSARELLI, E. et al. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. **Cancer**, v. 104, n. 11, p. 2430-6, Dec 01 2005. ISSN 0008-543X (Print)0008-543x. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1002/cncr.21476> &gt;.

MASSON, A. L. et al. Copy number variants associated with 18p11.32, DCC and the promoter 1B region of APC in colorectal polyposis patients. **Meta Gene**, v. 7, p. 95-104, Feb

2016. ISSN 2214-5400 (Print)2214-5400. Disponível em: &lt;  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2015.12.005> &gt;.

MATSUDA-LENNIKOV, M. et al. Lysosomal interaction of Akt with Phafin2: a critical step in the induction of autophagy. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e79795, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079795> &gt;.

MAVROS, A. et al. Infrequent genetic alterations of the tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **J Oral Pathol Med**, v. 31, n. 5, p. 270-6, May 2002. ISSN 0904-2512 (Print)0904-2512. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

MEHRPOUR, M. et al. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. **Cell Res**, v. 20, n. 7, p. 748-62, Jul 2010. ISSN 1001-0602. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.82> &gt;.

MENDE, I. et al. Oncogenic transformation induced by membrane-targeted Akt2 and Akt3. **Oncogene**, v. 20, n. 32, p. 4419-23, Jul 19 2001. ISSN 0950-9232 (Print)0950-9232. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204486> &gt;.

METJIAN, A. et al. Agonists cause nuclear translocation of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. A Gbetagamma-dependent pathway that requires the p110gamma amino terminus. **J Biol Chem**, v. 274, n. 39, p. 27943-7, Sep 24 1999. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

MIGALDI, M. et al. Tumor cell proliferation and microsatellite alterations in human ameloblastoma. **Oral Oncol**, v. 44, n. 1, p. 50-60, Jan 2008. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2006.12.004> &gt;.

MILELLA, M. et al. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. **Front Oncol**, v. 5, p. 24, 2015. ISSN 2234-943X (Print)2234-943x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2015.00024> &gt;.

MIRZA, A. M. et al. Oncogenic transformation of cells by a conditionally active form of the protein kinase Akt/PKB. **Cell Growth Differ**, v. 11, n. 6, p. 279-92, Jun 2000. ISSN 1044-9523 (Print)1044-9523. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

MIYAHARA, L. A. N. et al. PTEN allelic loss is an important mechanism in the late stage of development of oral leukoplakia into oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, Aug 31 2017. ISSN 0309-0167. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/his.13381> &gt;.

MOLINOLO, A. A. et al. mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 9, p. 2558-68, May 01 2012. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-11-2824> &gt;.

MOURAO, R. V. et al. Study of the relationship between mononuclear inflammatory infiltrate and Ki-67 and basement membrane and extracellular matrix protein expression in radicular cysts. **Int Endod J**, v. 49, n. 5, p. 447-53, May 2016. ISSN 0143-2885. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/iej.12472> &gt;.

MULLER, S. Update from the 4th Edition of the World Health Organization of Head and Neck Tumours: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. **Head Neck Pathol**, v. 11, n. 1, p. 33-40, Mar 2017. ISSN 1936-055x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1007/s12105-017-0792-3> &gt;.

MUTTER, G. L. Diagnosis of premalignant endometrial disease. **J Clin Pathol**, v. 55, n. 5, p. 326-31, May 2002. ISSN 0021-9746 (Print)0021-9746. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

NAKAMURA, T. et al. Analysis of loss of heterozygosity in circulating DNA. **Methods Mol Biol**, v. 520, p. 221-9, 2009. ISSN 1064-3745 (Print)1064-3745. Disponível em: &lt; [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-811-9\\_16](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-811-9_16) &gt;.

NAPIER, S. S.; SPEIGHT, P. M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 1, p. 1-10, Jan 2008. ISSN 0904-2512. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00579.x> &gt;.

NARAYAN, T. V.; SHILPASHREE, S. Meta-analysis on clinicopathologic risk factors of leukoplakias undergoing malignant transformation. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 20, n. 3, p. 354-361, Sep-Dec 2016. ISSN 0973-029X (Print)0973-029x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.4103/0973-029x.190900> &gt;.

NICHOLSON, K. M.; ANDERSON, N. G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. **Cell Signal**, v. 14, n. 5, p. 381-95, May 2002. ISSN 0898-6568 (Print)0898-6568. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

NICHOLSON, K. M.; STREULI, C. H.; ANDERSON, N. G. Autocrine signalling through erbB receptors promotes constitutive activation of protein kinase B/Akt in breast cancer cell

lines. **Breast Cancer Res Treat**, v. 81, n. 2, p. 117-28, Sep 2003. ISSN 0167-6806 (Print)0167-6806. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1023/a:1025765215765> &gt;.

NIELSEN, M. D. et al. 14-3-3 Epsilon antagonizes FoxO to control growth, apoptosis and longevity in Drosophila. **Aging Cell**, v. 7, n. 5, p. 688-99, Oct 2008. ISSN 1474-9718. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00420.x> &gt;.

NOGUCHI, M.; HIRATA, N.; SUIZU, F. The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy. **Biochim Biophys Acta**, v. 1846, n. 2, p. 342-52, Dec 2014. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.07.013> &gt;.

NUNES, D. N.; KOWALSKI, L. P.; SIMPSON, A. J. Detection of oral and oropharyngeal cancer by microsatellite analysis in mouth washes and lesion brushings. **Oral Oncol**, v. 36, n. 6, p. 525-8, Nov 2000. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

OGBUREKE, K. U. et al. Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. **Oral Oncol**, v. 43, n. 9, p. 920-32, Oct 2007. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2006.11.011> &gt;.

OKI, E. et al. Impact of loss of heterozygosity of encoding phosphate and tensin homolog on the prognosis of gastric cancer. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 21, n. 5, p. 814-8, May 2006. ISSN 0815-9319 (Print)0815-9319. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1746.2005.04028.x> &gt;.

OLEINIK, N. V.; KRUPENKO, N. I.; KRUPENKO, S. A. Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway. **Oncogene**, v. 26, n. 51, p. 7222-30, Nov 08 2007. ISSN 0950-9232 (Print)0950-9232. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210526> &gt;.

OSUKA, S. et al. IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. **Stem Cells**, v. 31, n. 4, p. 627-40, Apr 2013. ISSN 1066-5099. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1002/stem.1328> &gt;.

PITIYAGE, G. et al. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. **J Oral Pathol Med**, v. 38, n. 10, p. 737-52, Nov 2009. ISSN 0904-2512. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00804.x> &gt;.



PITOT, H. C. Animal models of neoplastic development. **Dev Biol (Basel)**, v. 106, p. 53-7; discussion 57-9, 143-60, 2001. ISSN 1424-6074 (Print)1424-6074. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/> &gt;.

PORTA, C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. **Front Oncol**, v. 4, p. 64, 2014. ISSN 2234-943X (Print)2234-943x. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2014.00064> &gt;.

QUATTRONE, A. et al. Frequent mono-allelic loss associated with deficient PTEN expression in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. **Mod Pathol**, v. 27, n. 11, p. 1510-20, Nov 2014. ISSN 0893-3952. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2014.53> &gt;.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 1, p. 47-62, Jan 2003. ISSN (Online) 1544-1113. Disponível em: &lt;<https://doi.org/10.1177/154411130301400105> &gt;.

REICHART, P. A.; PHILIPSEN, H. P. Oral erythroplakia--a review. **Oral Oncol**, v. 41, n. 6, p. 551-61, Jul 2005. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2004.12.003> &gt;.

RIBEIRO, A. S. et al. A review of the nonsurgical treatment of oral leukoplakia. **Int J Dent**, v. 2010, p. 186018, 2010. ISSN 1687-8728. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1155/2010/186018> &gt;.

RIZVI, M. M. et al. Allelic loss of 10q23.3, the PTEN gene locus in cervical carcinoma from Northern Indian population. **Pathol Oncol Res**, v. 18, n. 2, p. 309-13, Apr 2012. ISSN 1219-4956. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1007/s12253-011-9446-z> &gt;.

ROSIN, M. P. et al. 3p14 and 9p21 loss is a simple tool for predicting second oral malignancy at previously treated oral cancer sites. **Cancer Res**, v. 62, n. 22, p. 6447-50, Nov 15 2002. ISSN 0008-5472 (Print)0008-5472. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/> &gt;.

ROSIN, M. P. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 2, p. 357-62, Feb 2000. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/> &gt;.

ROWLEY, H. et al. Definition of a tumor suppressor gene locus on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the head and neck by means of microsatellite markers. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 122, n. 5, p. 497-501, May 1996. ISSN 0886-4470 (Print)0886-4470. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/> &gt;.

SCHWARZENBACH, H. et al. Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 20, p. 5719-30, Oct 15 2012. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-12-0142> &gt;.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Dis**, v. 15, n. 6, p. 388-99, Sep 2009. ISSN 1354-523x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01563.x> &gt;.

SEHGAL, V.; RAM, P. T. Network Motifs in JNK Signaling. **Genes Cancer**, v. 4, n. 9-10, p. 409-13, Sep 2013. ISSN 1947-6019 (Print)1947-6019. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1177/1947601913507577> &gt;.

SHAO, X. et al. Mutational analysis of the PTEN gene in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 77, n. 5, p. 684-8, Aug 31 1998. ISSN 0020-7136 (Print)0020-7136. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

SHETTY, P. et al. Oral Leukoplakia: Clinicopathological Correlation and Its Relevance to Regional Tobacco-related Habit Index. **J Contemp Dent Pract**, v. 17, n. 7, p. 601-8, Jul 01 2016. ISSN 1526-3711. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

SILVEIRA, E. J. et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int J Surg Pathol**, v. 15, n. 4, p. 376-83, Oct 2007. ISSN 1066-8969 (Print)1066-8969. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1177/1066896907304992> &gt;.

SIMPSON, L.; PARSONS, R. PTEN: life as a tumor suppressor. **Exp Cell Res**, v. 264, n. 1, p. 29-41, Mar 10 2001. ISSN 0014-4827 (Print)0014-4827. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1006/excr.2000.5130> &gt;.

SINHA, S. et al. Frequent deletion and methylation in SH3GL2 and CDKN2A loci are associated with early- and late-onset breast carcinoma. **Ann Surg Oncol**, v. 15, n. 4, p. 1070-80, Apr 2008. ISSN 1068-9265. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-007-9790-0> &gt;.

SMITH, J. et al. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. **Oral Oncol**, v. 45, n. 8, p. 647-53, Aug 2009. ISSN 1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.02.006> &gt;.

SNADDON, J. et al. Detection of functional PTEN lipid phosphatase protein and enzyme activity in squamous cell carcinomas of the head and neck, despite loss of heterozygosity at this locus. **Br J Cancer**, v. 84, n. 12, p. 1630-4, Jun 15 2001. ISSN 0007-0920 (Print)0007-0920. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1054/bjoc.2001.1848> &gt;.

SNIETURA, M. et al. PTEN as a prognostic and predictive marker in postoperative radiotherapy for squamous cell cancer of the head and neck. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33396, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0033396> &gt;.

SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 1, p. 59-71, Jan-Mar 2005. ISSN 1582-1838 (Print)1582-1838. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

SONG, Z. et al. Loss of heterozygosity of the tumor suppressor gene Tg737 in the side population cells of hepatocellular carcinomas is associated with poor prognosis. **Mol Biol Rep**, v. 37, n. 8, p. 4091-101, Dec 2010. ISSN 0301-4851. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0069-3> &gt;.

SPAFFORD, M. F. et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 3, p. 607-12, Mar 2001. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

SQUARIZE, C. H. et al. PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. **Neoplasia**, v. 15, n. 5, p. 461-71, May 2013. ISSN 1476-5586. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

SQUARIZE, C. H.; CASTILHO, R. M.; 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**, v. 31, n. 7, p. 379-84, Aug 2002. ISSN 0904-2512 (Print)0904-2512. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

STAAL, S. P. 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 U S A**, v. 84, n. 14, p. 5034-7, Jul 1987. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

SUN, M. et al. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. **Am J Pathol**, v. 159, n. 2, p. 431-7, Aug 2001. ISSN 0002-9440 (Print)0002-9440. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

SUSHMA, P. S. et al. PTEN and p16 genes as epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on south Indian population. **Tumour Biol**, v. 37, n. 6, p. 7625-32, Jun 2016. ISSN 1010-4283. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-4648-8> &gt;.

SZUKALA, K. et al. Does loss of heterozygosity in critical genome regions predict a local relapse in patients after laryngectomy? **Mutat Res**, v. 600, n. 1-2, p. 67-76, Aug 30 2006. ISSN 0027-5107 (Print)0027-5107. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.027> &gt;.

TABOR, M. P. et al. Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. **J Pathol**, v. 199, n. 3, p. 354-60, Mar 2003. ISSN 0022-3417 (Print)0022-3417. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1002/path.1285> &gt;.

TAKAMURA, A. et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. **Genes Dev**, v. 25, n. 8, p. 795-800, Apr 15 2011. ISSN 0890-9369. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.2016211> &gt;.

TANAKA, K. et al. Evidence that a phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-binding protein can function in nucleus. **J Biol Chem**, v. 274, n. 7, p. 3919-22, Feb 12 1999. ISSN 0021-9258 (Print)0021-9258. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

TANAKA, T.; ISHIGAMORI, R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. **J Oncol**, v. 2011, p. 603740, 2011. ISSN 1687-8450. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1155/2011/603740> &gt;.

TENBAUM, S. P. et al. beta-catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. **Nat Med**, v. 18, n. 6, p. 892-901, Jun 2012. ISSN 1078-8956. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2772> &gt;.

THIAGALINGAM, S. et al. Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 5, p. 2698-702, Feb 27 2001. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.051625398> &gt;.

TOKUNAGA, E. et al. Coexistence of the loss of heterozygosity at the PTEN locus and HER2 overexpression enhances the Akt activity thus leading to a negative progesterone receptor expression in breast carcinoma. **Breast Cancer Res Treat**, v. 101, n. 3, p. 249-57, Mar 2007. ISSN 0167-6806 (Print)0167-6806. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-006-9295-8> &gt;.

TZENAKI, N.; PAPAKONSTANTI, E. A. p110delta PI3 kinase pathway: emerging roles in cancer. **Front Oncol**, v. 3, p. 40, 2013. ISSN 2234-943X (Print)2234-943x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2013.00040> &gt;.

UENO, N. T.; MAMOUNAS, E. P. Neoadjuvant nab-paclitaxel in the treatment of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 156, n. 3, p. 427-440, Apr 2016. ISSN 0167-6806. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-016-3778-z> &gt;.

VAN DE SANDE, T. et al. High-level expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB. **J Pathol**, v. 206, n. 2, p. 214-9, Jun 2005. ISSN 0022-3417 (Print)0022-3417. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1002/path.1760> &gt;.

VAN DER HEIDE, L. P.; HOEKMAN, M. F.; SMIDT, M. P. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. **Biochem J**, v. 380, n. Pt 2, p. 297-309, Jun 01 2004. ISSN 0264-6021. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1042/bj20040167> &gt;.

VAN DER HEM, P. S. et al. The results of CO2 laser surgery in patients with oral leukoplakia: a 25 year follow up. **Oral Oncol**, v. 41, n. 1, p. 31-7, Jan 2005. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2004.06.010> &gt;.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 317-23, Apr-May 2009. ISSN 1368-8375. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.05.016> &gt;.

VAN HOUTEN, V. M. et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 10, p. 3803-16, Oct 2000. ISSN 1078-0432 (Print)1078-0432. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

VASCONCELOS, M. G. et al. Distribution of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha and Glucose Transporter-1 in Human Tongue Cancers. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 73, n. 9, p. 1753-60, Sep 2015. ISSN 0278-2391. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2015.03.013> &gt;.

VASKO, V. et al. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. **J Med Genet**, v. 41, n. 3, p. 161-70, Mar 2004. ISSN 0022-2593. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.

VELASCO, A. et al. Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma. **Int J Gynecol Pathol**, v. 27, n. 3, p. 305-17, Jul 2008. ISSN 0277-1691. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1097/PGP.0b013e31815daf1a> &gt;.

VELICKOVIC, M. et al. Intragenic PTEN/MMAC1 loss of heterozygosity in conventional (clear-cell) renal cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. **Mod Pathol**, v. 15, n. 5, p. 479-85, May 2002. ISSN 0893-3952 (Print)0893-3952. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3880551> &gt;.

VIEIRA, F. L. et al. Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading. **BMC Oral Health**, v. 8, p. 25, Sep 02 2008. ISSN 1472-6831. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1186/1472-6831-8-25> &gt;.

WAGNER, E. F.; NEBREDA, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 8, p. 537-49, Aug 2009. ISSN 1474-175x. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1038/nrc2694> &gt;.

WANG, H. et al. ABT-737 induces Bim expression via JNK signaling pathway and its effect on the radiation sensitivity of HeLa cells. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52483, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052483> &gt;.

WANG, X. et al. Intratumor genomic heterogeneity correlates with histological grade of advanced oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 42, n. 7, p. 740-4, Aug 2006. ISSN 1368-8375 (Print)1368-8375. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.11.018> &gt;.

WANG, X.; HUANG, H.; YOUNG, K. H. The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. **Aging (Albany NY)**, v. 7, n. 12, p. 1032-49, Dec 2015. ISSN 1945-4589. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.18632/aging.100855> &gt;.

WANG, Y.; LIU, X.; LI, Y. Target genes of microsatellite sequences in head and neck squamous cell carcinoma: mononucleotide repeats are not detected. **Gene**, v. 506, n. 1, p. 195-201, Sep 10 2012. ISSN 0378-1119. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.056> &gt;.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 3, p. 127-33, Mar 2008. ISSN 0904-2512. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00584.x> &gt;.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med**, v. 36, n. 10, p. 575-80, Nov 2007. ISSN 0904-2512 (Print)0904-2512. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x> &gt;.

WATANABE, S. et al. Activation of PI3K-AKT pathway in oral epithelial dysplasia and early cancer of tongue. **Bull Tokyo Dent Coll**, v. 50, n. 3, p. 125-33, Aug 2009. ISSN 0040-8891 (Print)0040-8891. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/> &gt;.

WEST, K. A.; CASTILLO, S. S.; DENNIS, P. A. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. **Drug Resist Updat**, v. 5, n. 6, p. 234-48, Dec 2002. ISSN 1368-7646 (Print)1368-7646. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/> &gt;.

WESTON, C. R.; DAVIS, R. J. The JNK signal transduction pathway. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, n. 2, p. 142-9, Apr 2007. ISSN 0955-0674 (Print)0955-0674. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.001> &gt;.

WESTRA, W. H.; LEWIS, J. S., JR. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. **Head Neck Pathol**, v. 11, n. 1, p. 41-47, Mar 2017. ISSN 1936-055x. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1007/s12105-017-0793-2> &gt;.

WOLFF, K. D.; FOLLMANN, M.; NAST, A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. **Dtsch Arztebl Int**, v. 109, n. 48, p. 829-35, Nov 2012. ISSN 1866-0452. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.3238/arztebl.2012.0829> &gt;.

WON, H. S. et al. Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 48, n. 10, p. 985-90, Oct 2012. ISSN 1368-8375. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.04.013> &gt;.

XI, Y.; CHEN, Y. Oncogenic and Therapeutic Targeting of PTEN Loss in Bone Malignancies. **J Cell Biochem**, v. 116, n. 9, p. 1837-47, Sep 2015. ISSN 0730-2312. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1002/jcb.25159> &gt;.

XIE, X. et al. IkappaB kinase epsilon and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 16, p. 6474-9, Apr 19 2011. ISSN 0027-8424. Disponível em: &lt;<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1016132108> &gt;.

- YAMADA, K. M.; ARAKI, M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 13, p. 2375-82, Jul 2001. ISSN 0021-9533 (Print)0021-9533. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.
- YE, M.; LI, J.; GONG, J. PCDH10 gene inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells. **Oncol Rep**, v. 37, n. 6, p. 3167-3174, Jun 2017a. ISSN 1021-335x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.3892/or.2017.5630> &gt;.
- YOKOTA, T. et al. Metastatic breast carcinoma masquerading as primary colon cancer. In: (Ed.). **Am J Gastroenterol**. United States, v.95, 2000. p.3014-6. ISBN 0002-9270 (Print)0002-9270 (Linking).
- YU, S. et al. FOXO3a promotes gastric cancer cell migration and invasion through the induction of cathepsin L. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 34773-84, Jun 07 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.8977> &gt;.
- YU, Z. et al. Phosphorylation of Akt (Ser473) predicts poor clinical outcome in oropharyngeal squamous cell cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n. 3, p. 553-8, Mar 2007. ISSN 1055-9965 (Print)1055-9965. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-06-0121> &gt;.
- YUAN, T. L.; CANTLEY, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5497-510, Sep 18 2008. ISSN 0950-9232. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2008.245> &gt;.
- ZAITSU, Y. et al. Loss of heterozygosity of PTEN (encoding phosphate and tensin homolog) associated with elevated HER2 expression is an adverse prognostic indicator in gastric cancer. **Oncology**, v. 88, n. 3, p. 189-94, 2015. ISSN 0030-2414. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1159/000368984> &gt;.
- ZHANG, L. et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 5, n. 9, p. 1081-9, Sep 2012. ISSN 1940-6215. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.capr-12-0173> &gt;.
- ZHANG, L.; ROSIN, M. P. Loss of heterozygosity: a potential tool in management of oral premalignant lesions? **J Oral Pathol Med**, v. 30, n. 9, p. 513-20, Oct 2001. ISSN 0904-2512 (Print)0904-2512. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/> &gt;.
- ZHOU, J. et al. Catalpol ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and adipose tissue inflammation by suppressing the JNK and NF-kappaB pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 467, n. 4, p. 853-8, Nov 27 2015. ISSN 0006-291x. Disponível em: &lt; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.054> &gt;.



**ANEXOS**

**ANEXO A – Seguimento do Regimento Interno**

Art. 46 – As dissertações e as teses apresentadas ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará poderão ser produzidas em formato alternativo ou tradicional. O formato alternativo estabelece: a critério do orientador e com a aprovação da Coordenação do Programa, que os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou co-autoria do candidato, publicados ou submetidos para

11

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**

---

publicação em revistas científicas, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§1º - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

§2º - A dissertação e a tese em formatos tradicionais ou formatos alternativos deverão seguir as normas preconizadas pelo Guia para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da Biblioteca Universitária disponível no sítio <http://www.biblioteca.ufc.br>. As partes específicas do formato alternativo deverão ser feitas em concordância com o *Manual de Normalização para Defesa de dissertação de Mestrado e tese de Doutorado no formato Alternativo do PPGO*, disponível no sítio <http://www.ppggo.ufc.br>.

## ANEXO B: Certificação de língua portuguesa

---

Declaro, junto à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará – UFC, que procedi à correção gramatical da tese intitulada: Estudo da Via PI3K/AKT e da Perda de Heterozigosidade do Gene Supressor Tumoral *PTEN* em Lesões Potencialmente Malignas e Carcinoma Epidermoide Oral, de autoria do sr. Filipe Nobre Chaves

Fortaleza, 1º de novembro de 2017



Jacqueline Silva Bastos

Professora de Língua Portuguesa

Graduada pela UFC

Nº de Registro 56134, Livro GCF-72, Folha 121

## ANEXO C: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ

## PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Rede de diagnóstico e políticas públicas em controle de câncer oral: identificação de conhecimento, capacitação profissional, estudo clínico-patológico e imunohistoquímico.

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 05958512.3.0000.5054

**Pesquisador:** Ana Paula Negreiros Nunes Alves

**Instituição:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 94.432

**Data da Relatoria:** 09/08/2012

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo observacional, analítico e transversal dividido em duas fases:  
Análise de conhecimento, estruturação da rede de diagnóstico e avaliação de fluxo.  
Diagnóstico e análise imuno-molecular de lesões malignas e potencialmente malignas.

**Objetivo da Pesquisa:**

Ampiar uma rede de diagnóstico e política públicas no controle do câncer oral em municípios-piloto no interior do estado do Ceará e investigar moléculas sinalizadoras no câncer oral neste contexto populacional.  
Estruturar e fortalecer uma rede de diagnóstico em câncer e Estratégia de Saúde da Família e Centro de Especialidades Odontológicas.  
Avaliar o fluxo de pacientes da rede de diagnósticos no Município-piloto.  
Capacitar e sensibilizar os profissionais cirurgiões-dentistas e agentes comunitários de saúde no rastreamento das lesões potencialmente malignas e do câncer oral.  
Criar a contra referência mensal de casos de lesões potencialmente malignas e câncer oral para o município-piloto.  
Descrever o perfil clínico-patológico das lesões potencialmente malignas e câncer oral no município de estudo.  
Verificar a imunexpressão de IP3K, p-AKT, p-JNK, e Ki 67 nas lesões potencialmente malignas e no câncer oral.  
Estabelecer uma política pública no controle de câncer oral municipal.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A pesquisa apresenta risco mínimo e poderá contribuir com mais informações para o estudo do câncer oral.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo relevante, do ponto de vista da saúde pública, cujos resultados poderão influenciar na conduta diante do problema.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi apresentado de forma satisfatória, os demais documentos exigidos estavam de acordo com o exigido.

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1127  
**Bairro:** Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-270  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3388-8344 **Fax:** (85)3223-2903 **E-mail:** comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
CEARÁ/ PROPESQ



**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto aprovado por este comitê

FORTALEZA, 11 de Setembro de 2012

---

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127  
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-270  
UF: CE Município: FORTALEZA  
Telefone: (85)3388-8344 Fax: (85)3225-2903 E-mail: [conep@ufc.br](mailto:conep@ufc.br)

## ANEXO D

**ORAL DISEASES**  
Leading in Oral, Maxillofacial, Head & Neck Medicine

Oral Diseases (2017) 23, 367–378 doi:10.1111/iod.12623  
© 2016 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd  
All rights reserved  
www.wiley.com

## ORIGINAL ARTICLE

## Evaluation of the p-AKT, p-JNK and FoxO3a function in oral epithelial dysplasia

FN Chaves<sup>1</sup>, TMM Bezerra<sup>2</sup>, PG de Barros Silva<sup>2</sup> , FAF Oliveira<sup>2</sup>, FB Sousa<sup>2</sup>, FWG Costa<sup>2</sup>, APNN Alves<sup>2</sup>, KMA Pereira<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>School of Dentistry, Federal University of Ceara/Sobral, Sobral, Ceara, Brazil; <sup>2</sup>Division of Oral Pathology, Department of Dental Clinic, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

**OBJECTIVES:** To evaluate the expression of p-AKT, p-JNK, FoxO3a, and Ki-67 in samples of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and oral epithelial dysplasias (OEDs) to understand their possible involvement in the malignant transformation process of oral lesions.

**MATERIALS AND METHODS:** Tissue samples of 20 cases of OSCCs, 20 OEDs, and normal oral mucosa were subjected to immunohistochemistry reactions for anti-p-AKT, anti-p-JNK, anti-FoxO3a, and anti-Ki-67 antibodies. It was analyzed using quantitative (number of immunostained cells) and qualitative (immunostaining intensity) parameters in different cell immunostaining sublocations.

**RESULTS:** Nuclear p-AKT was observed significantly greater immunostaining in OSCC ( $21.2 \pm 19.0$ ) than in dysplasias ( $7.9 \pm 8.1$ ) and controls ( $1.8 \pm 4.7$ ) ( $P = 0.002$ ). Immunostaining of strong nuclear p-JNK was greater in controls ( $48.3 \pm 13.7$ ) than in OEDs ( $11.0 \pm 10.3$ ) and OSCCs ( $1.1 \pm 1.3$ ) ( $P < 0.001$ ). Strong nuclear immunostaining of FoxO3a proved to be absent in OSCCs ( $0.0 \pm 0.1$ ) with little staining on dysplasias ( $3.2 \pm 5.4$ ) and increased expression in controls ( $13.5 \pm 4.8$ ) ( $P < 0.001$ ). Immunostaining of strong nuclear Ki-67 was greater in OSCCs ( $48.1 \pm 49.6$ ) than in OED ( $11.8 \pm 10.6$ ) and controls ( $1.9 \pm 2.0$ ) ( $P < 0.001$ ).

**CONCLUSIONS:** Malignant process of OEDs in this research may involve the same mechanisms of established malignant lesions.

*Oral Diseases* (2017) 23, 367–378

**Keywords:** oral squamous cell carcinoma; oral epithelial dysplasia; immunohistochemistry; p-AKT; p-JNK; FoxO3a

Correspondence: Kátzia Maria Alves Pereira, Ph.D, MSc, DDS, Federal University of Ceará Campus Sobral, Rua Coronel Estanislau Fogaça, S/N – CEP 62.010-560, Centro, Sobral, Ceará, Brazil. Tel/Fax: +55 (88) 3613 2609, E-mail: katziaalves@yahoo.com.br  
Received 21 July 2016; revised 6 November 2016; accepted 2 December 2016

### Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) and pharyngeal cancer represent the sixth most common solid cancers around the world (Warnakulasuriya, 2009). Most patients with OSCC present with locally advanced disease and need multimodality therapy that may include surgery, radiotherapy, chemotherapy, and molecular therapy (Warnakulasuriya, 2009; Scully and Bagan, 2009). Thus, understanding the molecular pathways of OSCC carcinogenesis and progression would be helpful in improving the diagnosis, therapy, and prevention of this disease (Scully and Bagan, 2009).

It is widely accepted that OSCC can arise from a pre-malignant lesion (LPM) (Scully and Bagan, 2009). However, not all LPMs become malignant, and oral epithelial dysplasia (OED) histopathology is an important predictor of malignancy (Warnakulasuriya *et al.*, 2008; Scully and Bagan, 2009). Currently, the association between the degree of oral dysplasia and malignant transformation remains debatable (Warnakulasuriya *et al.*, 2008). Additional study is therefore necessary to improve the histological grading of dysplasias. Furthermore, a better understanding of changes in molecular and biochemical processes in dysplasias may help identify specific biomarkers that, together with histological parameters, can lead to a more accurate diagnosis of the risk of malignant transformation of these lesions.

The PI3K/AKT signaling pathway is one of the most frequently deregulated pathways in cancer (Giudice and Squarize, 2013). The constant activation of this pathway in cancer is often a consequence of increased expression of genes that encode either class I PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) subunits (e.g., 110 $\alpha$ ) or AKT (protein kinase B), or is a result of genetic mutations that inhibit negative regulators of the PI3K/AKT pathway such as PTEN (phosphatase and tensin homolog) (Lam *et al.*, 2006).

FoxO (forkhead box O) is a major target of p-AKT. Once it is phosphorylated, it loses its tumor suppressor function because it is translocated from the nucleus to the

cytoplasm, inducing cell death. p-AKT also reduces the ability of FoxO to bind to DNA and enhances its degradation. Cytoplasmic FoxO can be relocated to the nucleus by the presence of JNK (c-Jun N-terminal kinase), which is activated by stress, resulting in increased FoxO transcriptional activity (Lam *et al*, 2006). JNK is also responsible for phosphorylation of 14-3-3 chaperone proteins. This function results in the release of transcription factors linked to FoxO, as these proteins retain FoxO in the cytoplasm (Van der Heide *et al*, 2004; Lam *et al*, 2006). In OSCC, it has been suggested that FoxO3a activity can be important in malignant transformation and that tumor progression occurs through CDK4/6 and cyclin D1 inhibition, as well as p27 and Bim accumulation (Fang *et al*, 2011a).

Genetic and epigenetic alterations occur during malignant transformation, but the prognostic meaning of the earliest genetic changes in malignancy remains unclear, as the progression of genetic damage over time has not yet been demonstrated (Warnakulasuriya *et al*, 2008). In addition, histopathology, even today, is the established method for assessing the risk of premalignant lesions, indicating the need for better models of biological risk (Massarelli *et al*, 2005). Given the above, the current study sought to understand the malignant transformation process of OEDs through the expression of biomarkers involved in the PI3K/AKT pathway using immunohistochemistry. Comparisons regarding the immunoreactivity of these biomarkers with OSCCs were also carried out.

## Materials and methods

This study consisted of an observational, analytical, and cross-sectional study, using the diagnosis and immunomolecular analysis of malignant and premalignant lesions. We analyzed 20 cases of OEDs, 20 cases of OSCCs, and five cases of normal oral epithelium (NOE). All samples were embedded in paraffin and obtained from incisional biopsies from patients of the Outpatient Stomatology Clinic of the Federal University of Ceará Sobral Campus. Samples were collected from January 2012 to December 2015. The Research Ethics Committee of the Federal University of Ceará/Department of Clinical Medicine approved this clinical laboratory study under protocol No. 94432, and the written informed consent was obtained from all patients.

### Histomorphometric analysis

Specimens were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned at 5  $\mu$ m, stained with hematoxylin-eosin, and mounted on glass slides for histopathological analysis.

Oral epithelial dysplasia specimens were classified using a binary low/high system of grading dysplasia for predicting malignant transformation (Warnakulasuriya *et al*, 2008). OSCC specimens were categorized according to the WHO classification (Bates *et al*, 2005).

The results of this classification were as follows: 10 were low risk of OEDs, 10 were high risk of OEDs, and 11 were well-differentiated OSCCs and nine were moderately differentiated OSCCs.

### Immunohistochemical reaction

For immunohistochemistry, 3-mm-thick sections were cut from paraffin-embedded material. All tissue samples were processed using standard methods, and serial sections were used for immunohistochemical reaction (IHC). After deparaffinization and rehydration, slides were subjected to heat-induced epitope retrieval (antigen retrieval buffers in Table 1) in a Pascal water bath (DakoCytomation). Endogenous peroxidase activity was blocked for 30 min with 0.3% hydrogen peroxide followed by 1% protein blocking for 10 min. The sections were incubated with primary antibodies describe in Table 1 (clone, manufacturer, dilution, antigen retrieval, and incubation). The samples were then incubated with the secondary antibody LSAB Kit (DAKO<sup>®</sup>, Carpinteria, CA, USA) for 10 min at room temperature. Next, development was performed using a chromogen solution prepared with DAB (3,3'-diaminobenzidine), for 5 min in a dark chamber (DAKO<sup>®</sup>, Carpinteria, CA, USA), and Harris hematoxylin was used for counterstaining.

Finally, coverslips were placed on the samples on glass slides, which were examined under a Leica DM 2000 optical microscope. A positive control was included in each reaction along with the samples. A negative control lacking primary antibody was performed in parallel with incubation of the experimental samples.

### Evaluation of IHC staining

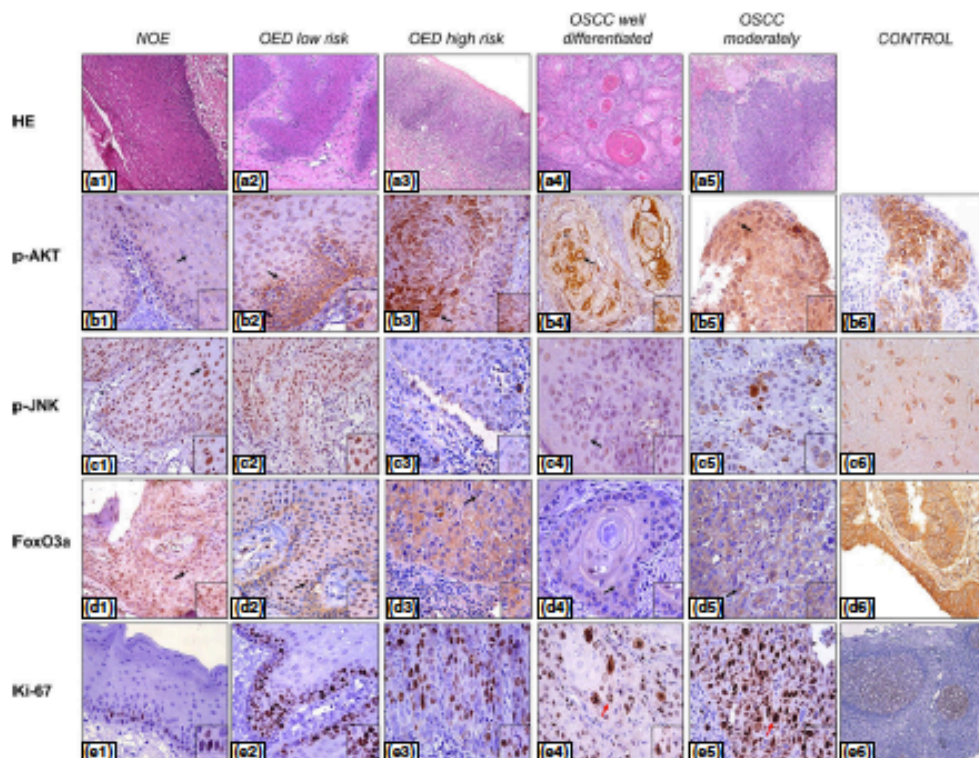
The presence of brown color was used as the parameter for positive antigen labeling in all samples. Fields that were the highest signal (hot spot) were selected for imaging. Five fields were selected (adapted from Kruse-Löfner *et al*, 2005), visualized, and captured at 400 $\times$  magnification with a Leica DFC295 HD digital camera using Las software at maximum resolution. Measurement of protein levels through conventional immunohistochemistry often cannot provide accurate results because the pathologist tends to group the immunoblots only as positive or negative. Furthermore, the use of cutoffs often impairs immunohistochemical analysis because values close to the cutoffs are still classified as 'high' and 'low' protein expressions (Yu *et al*, 2007). Thus, this study sought to not use scores in the analysis pattern.

Quantitative analysis of protein expression was performed by counting the number, in absolute values, of immunostained cells according to a methodology adapted from Vasconcelos *et al* (2015) and using ImageJ software (Image and Processing Analysis in Java—Rohand, W.S., ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Two authors carried out the analysis at separate times while unaware of the clinical data, and any disagreement was resolved by discussion.

Qualitative analysis corresponded to the intensity of immunostaining, which was based on cells displaying no, weak, moderate, or strong staining (Figure 1) at the appropriate locations (nucleus, perinucleus,

Table 1 Antibody specifications

Antibody	Specification	Flask/concentration	Brand	Positive control	Dilution	Incubation time	Antigenic retrieval method
Anti-AKT1 (phospho S473)	Rabbit mono ab—clone EP2109Y	100 $\mu$ g	Abcam	Cervical cancer	1:100	Overnight	Tris-EDTA pH9,0
Anti-JNK1 + JNK2 + JNK3 (phospho T183 + T 183 + T221)	Rabbit mono ab—clone EPR5693	100 $\mu$ g/100 $\mu$ l/0.071–1.732 mg ml <sup>-1</sup>	Abcam	Brain	1:100	2 h	Citrate pH6
Anti-FoxO3A	Rabbit poli ab	100 $\mu$ g/50 $\mu$ l/1–1.12 mg ml <sup>-1</sup>	Abcam	Cervical cancer	1:100 (OSCC) 1:400 (OED)	60 min	Citrate pH6
KI-67	Rabbit mono ab	100 $\mu$ g/0.9–1 mg ml <sup>-1</sup>	Abcam	Lymph node	1:300	Overnight	Citrate pH6



**Figure 1** p-Akt immunoreactivity was found in the membrane, cytoplasm, nucleus, and perinucleus of malignant cells. In the NOE (B1), there was a weak cytoplasmic staining (arrow) and absence of immunoreactivity of p-AKT membrane (higher magnification). In OED, we found a bigger and stronger cytoplasmic immunostaining as it takes the high-risk classification (higher magnification) and observed a prevalence of moderate cytoplasmic immunostaining in B2 (arrow) and a greater prevalence of strong cytoplasmic immunostaining in B3 (arrow). Immunoreactivity of P-AKT was most observed in the membrane, cytoplasm, nucleus, and perinuclear region of OSCC cells (higher magnification in B4 and B5). In B4, it is shown a higher perinuclear marking (arrow), and in B5, it is observed higher nuclear staining (arrow). p-JNK immunoreactivity was found in the nucleus and cytoplasm of OSCC, OED, and NOE. There was a higher strong nuclear immunostaining directly associated with the gradation control (C1) to OED (C2 and C3) and OSCC (C4 and C5), and in C1, we observed a predominance of strong nuclear staining (greater magnification and arrow) while in C4 further weak nuclear immunostaining is more evident (greater magnification and arrow). Nuclear p-JNK expression in OSCC appears to be lost to the malignant transformation of the lesion advances. FoxO3a immunoreactivity was found in the nucleus and cytoplasm of malignant, dysplastic, and NOE cells. The loss of nuclear expression in FoxO3a looks similar to the patterns observed in p-JNK, showing a predominance of strong nuclear staining in D1 (arrow), and moderate and weak nuclear staining in D2 and D3 (greater magnification and arrow). Nuclear marking absence was more observed in OSCC (higher magnification D4 and D5). Greater cytoplasmic staining was observed in OSCC with the weak cytoplasmic labeling in D4 and the moderate in D5 (arrow and higher magnification). The Ki-67 immunoreactivity was found in the nucleoplasm and the nucleolus of malignant cells (higher magnification and arrows and E4 and E5), and in NOE, immunostaining was restricted to basal and parabasal epithelial layers (E1). The intensity and number of Ki-67-immunostained cells increase with progression of the malignant disease cells. [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

cytoplasm, or nuclear membrane) for each antibody according to methods adapted from previous studies (Choi *et al.*, 2005; Mourao *et al.*, 2016).

Qualitative and quantitative analyses were performed simultaneously on each field. Analysis consisted of counting the number of positive cells in each field and quantifying the intensity of immunoblots of specific cellular locations for each antibody as previously described. The levels of each protein within cells were normalized and then assessed using statistical analysis as follows.

#### Statistical analysis

Results of the above analyses were used to construct a database in an Excel spreadsheet. Then, these data were transferred to SPSS version

20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) running on a Windows system. The Kolmogorov-Smirnov normality testing was performed, and we utilized analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-test for comparisons between groups. The data were expressed as the mean and standard error of the mean (mean  $\pm$  s.e.m.) based on a 5% level of significance ( $P < 0.05$ ).

Previous data (Fillies *et al.*, 2005; Ayala *et al.*, 2010; Eckert *et al.*, 2011) were also used in order to meet the appropriate requirements for statistical analysis, and the sample size was calculated. The sample was been designed to provide a power of 80% and a confidence level of 95% to detect a significant differences in immunohistochemical results between the groups of patients with oral lesions. Additionally, the sample



was designed to sustain a 20% loss, resulting in a final sample estimated to include 20 patients.

## Results

### p-JNK

Immunohistochemical analysis of p-JNK revealed nuclear and cytoplasmic immunostaining in both normal and dysplastic epidermoid cells of all evaluated specimens (Figure 1).

The average number of cells with strong nuclear immunostaining was higher in controls compared with OED and OSCC samples ( $P < 0.001$ ). Conversely, the highest average number of cells with weak nuclear immunostaining was observed in OSCC samples ( $P < 0.001$ ). There was no difference between the average intensity of cytoplasmic immunostaining between the research groups (Table 2). There was a difference in strong nuclear immunostaining between the different gradations of OED ( $P = 0.049$ ) (Table 3).

There was no difference in nuclear and cytoplasmic p-JNK staining between the different sets of OSCC. Nevertheless, weak nuclear staining was highest in the OSCC groups, followed by OED and then the control group ( $P < 0.001$ ) (Table 2). These results indicate an inverse

association between the level of p-JNK in the nucleus and the degree of tissue dysplasia ( $P = 0.049$ ) (Table 3).

### FoxO3a

Immunohistochemical analysis of FoxO3a revealed nuclear and cytoplasmic signal in both normal and dysplastic cells of all evaluated specimens (Figure 1).

A higher average number of cells with nuclear immunostaining was found in NOE compared with OED and OSCC ( $P < 0.001$ ). Most of this signal was strong ( $P < 0.001$ ) and moderate ( $P < 0.001$ ) (Table 2). We also observed a difference in nuclear signal between different gradations of OED ( $P = 0.010$ ), with greater numbers of cells showing weak cytoplasmic signal in low-risk OED ( $P = 0.029$ ) (Table 3).

As seen in Table 4, we observed a difference in cytoplasmic immunostaining between NOE and different gradations of OED ( $P = 0.040$ ), with a higher level of staining in OSCC. This difference is better evidenced in cells displaying weak cytoplasm immunostaining, where a higher average number was observed in OSCC compared with NOE and HRD (High Risk Dysplasia) ( $P = 0.001$ ), and in cells with moderate cytoplasm immunostaining, where a higher average number was observed in NOE compared with low-risk OED ( $P = 0.019$ ).

Table 2 Mean and intensity of immunostained cells in membrane, cytoplasm, and nucleus of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma

Antibody/Staining	Cells			P
	NOE	OED	OSCC	
p-AKT/nuclear	1.8 ± 4.7	7.9 ± 8.1	21.2 ± 19.0 <sup>†</sup>	0.002
p-AKT/perinuclear	14.3 ± 8.1	20.2 ± 10.0	15.1 ± 9.5	0.181
p-AKT/strong cytoplasmic	14.9 ± 7.6	16.1 ± 11.0	8.2 ± 6.8 <sup>*</sup>	0.022
p-AKT/moderate cytoplasmic	44.8 ± 9.5	35.8 ± 8.4	28.2 ± 12.3 <sup>*</sup>	0.002
p-AKT/weak cytoplasmic	39.5 ± 10.9	42.8 ± 12.3	59.9 ± 15.7 <sup>†</sup>	<0.001
p-AKT/negative cytoplasmic	0.8 ± 0.6	5.2 ± 4.6 <sup>*</sup>	6.1 ± 5.5 <sup>*</sup>	0.032
p-AKT/strong membrane	0.0 ± 0.0	10.1 ± 10.3	17.7 ± 19.7 <sup>*</sup>	0.025
p-AKT/moderate membrane	0.0 ± 0.0	20.0 ± 12.2 <sup>*</sup>	18.9 ± 11.9 <sup>*</sup>	0.001
p-AKT/weak membrane	0.0 ± 0.0	19.3 ± 7.8 <sup>*</sup>	52.6 ± 21.7 <sup>†</sup>	<0.001
p-AKT/negative membrane	100.0 ± 0.0	50.6 ± 23.7 <sup>*</sup>	33.9 ± 20.8 <sup>†</sup>	<0.001
Ki67/strong nuclear	1.9 ± 2.0	11.8 ± 10.6	48.1 ± 49.6 <sup>†</sup>	<0.001
Ki67/weak nuclear	8.6 ± 3.1	13.3 ± 3.9 <sup>*</sup>	16.3 ± 4.8 <sup>*</sup>	<0.001
Ki67/moderate nuclear	3.3 ± 1.2	7.3 ± 3.2	20.2 ± 7.4 <sup>†</sup>	<0.001
Ki67/nuclear	12.3 ± 4.1	25.8 ± 9.1 <sup>*</sup>	54.6 ± 16.8 <sup>†</sup>	<0.001
p-JNK/strong nuclear	48.3 ± 13.7	11.0 ± 10.3 <sup>*</sup>	1.1 ± 1.3 <sup>†</sup>	<0.001
p-JNK/weak nuclear	9.9 ± 7.6	32.5 ± 12.0 <sup>*</sup>	49.8 ± 19.5 <sup>†</sup>	<0.001
p-JNK/moderate nuclear	14.4 ± 10.8	19.7 ± 15.5	17.7 ± 20.5	0.844
p-JNK/negative nuclear	27.5 ± 13.0	36.9 ± 18.4	31.4 ± 14.3	0.421
p-JNK/strong cytoplasmic	0.1 ± 0.3	0.4 ± 0.4	0.9 ± 1.0	0.090
p-JNK/weak cytoplasmic	21.5 ± 42.0	25.0 ± 24.5	17.4 ± 16.5	0.587
p-JNK/moderate cytoplasmic	0.2 ± 0.4	2.2 ± 3.6	1.8 ± 1.8	0.402
p-JNK/negative cytoplasmic	78.2 ± 41.8	72.3 ± 26.7	80.0 ± 16.7	0.606
FoxO3a/strong nuclear	13.5 ± 4.8	3.2 ± 5.4 <sup>*</sup>	0.0 ± 0.1 <sup>†</sup>	<0.001
FoxO3a/weak nuclear	8.8 ± 2.6	15.6 ± 11.9 <sup>*</sup>	3.3 ± 3.8 <sup>†</sup>	<0.001
FoxO3a/moderate nuclear	68.6 ± 10.7	15.8 ± 16.9 <sup>*</sup>	0.6 ± 0.8 <sup>†</sup>	<0.001
FoxO3a/negative nuclear	9.1 ± 3.6	65.4 ± 25.4 <sup>*</sup>	96.1 ± 4.3 <sup>†</sup>	<0.001
FoxO3a/strong cytoplasmic	0.0 ± 0.0	19.5 ± 32.7	5.0 ± 14.4	0.102
FoxO3a/weak cytoplasmic	10.0 ± 13.8	19.7 ± 16.9 <sup>*</sup>	41.6 ± 27.0 <sup>†</sup>	0.002
FoxO3a/moderate cytoplasmic	83.5 ± 10.6	35.4 ± 36.4 <sup>*</sup>	46.4 ± 28.4	0.014
FoxO3a/negative cytoplasmic	6.5 ± 4.9	25.3 ± 28.6	7.0 ± 8.8 <sup>†</sup>	0.015

NOE, normal oral epithelium; OED, oral epithelial dysplasia; OSCC, oral squamous cell carcinoma.

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs NOE.

<sup>†</sup> $P < 0.05$  vs OED, test: ANOVA/Bonferroni (media ± DP).

Table 3 Mean and intensity of immunostained cells in membrane, cytoplasm, and nucleus of low- and high-risk oral epithelial dysplasia

Antibody/Staining	OED		P
	Low risk	High risk	
p-AKT/nuclear	9.71 ± 9.58	6.11 ± 6.25	0.333
p-AKT/perinuclear	25.10 ± 8.06	15.25 ± 9.55	0.022*
p-AKT/strong cytoplasmic	15.93 ± 10.59	16.36 ± 11.91	0.933
p-AKT/moderate cytoplasmic	34.12 ± 5.75	37.50 ± 10.41	0.384
p-AKT/weak cytoplasmic	45.60 ± 13.01	40.01 ± 11.43	0.321
p-AKT/negative cytoplasmic	4.4 ± 2.8	6.1 ± 5.5	0.407
p-AKT/strong membrane	3.33 ± 4.37	16.92 ± 10.09	0.002*
p-AKT/moderate membrane	11.60 ± 8.06	28.33 ± 9.64	0.001*
p-AKT/weak membrane	17.65 ± 4.96	20.87 ± 9.91	0.375
p-AKT/negative membrane	67.4 ± 11.3	33.9 ± 20.8	<0.001
Ki67/strong nuclear	8.30 ± 7.51	15.33 ± 12.38	0.142
Ki67/weak nuclear	12.26 ± 3.68	14.32 ± 4.02	0.247
Ki67/moderate nuclear	6.87 ± 3.87	7.81 ± 2.57	0.530
Ki67/nuclear	23.79 ± 9.76	27.77 ± 8.34	0.340
p-JNK/strong nuclear	15.47 ± 11.33	6.50 ± 7.25	0.049*
p-JNK/weak nuclear	29.35 ± 11.01	35.59 ± 12.61	0.254
p-JNK/moderate nuclear	22.17 ± 14.07	17.14 ± 17.16	0.483
p-JNK/negative nuclear	33.03 ± 15.50	40.78 ± 20.99	0.360
p-JNK/strong cytoplasmic	0.32 ± 0.28	0.51 ± 0.47	0.286
p-JNK/weak cytoplasmic	25.37 ± 23.37	24.67 ± 26.87	0.951
p-JNK/moderate cytoplasmic	2.09 ± 3.19	2.39 ± 4.20	0.859
p-JNK/negative cytoplasmic	72.22 ± 25.85	72.46 ± 28.87	0.985
FoxO3a/strong nuclear	4.39 ± 6.50	1.96 ± 4.04	0.331
FoxO3a/weak nuclear	21.25 ± 12.03	9.98 ± 9.02	0.029*
FoxO3a/moderate nuclear	22.83 ± 13.08	8.76 ± 18.02	0.061
FoxO3a/negative nuclear	51.51 ± 15.00	79.28 ± 26.71	0.010*
FoxO3a/strong cytoplasmic	18.58 ± 30.69	20.51 ± 36.24	0.899
FoxO3a/weak cytoplasmic	29.12 ± 18.39	10.33 ± 8.28	0.012*
FoxO3a/moderate cytoplasmic	26.87 ± 26.80	43.89 ± 43.81	0.311
FoxO3a/negative cytoplasmic	25.42 ± 22.42	25.27 ± 35.00	0.991

OED, oral epithelial dysplasia.

\*P &lt; 0.05, test: Student's t-test (media ± DP).

#### p-AKT

Immunohistochemical analysis of p-AKT revealed nuclear, perinuclear, and cytoplasmic immunostaining in the dysplastic epidermoid cells of all evaluated specimens. Membrane staining was not observed in NOE (Figure 1).

We observed increased nuclear staining in OSCC compared with NOE and OED ( $P = 0.002$ ). A similar pattern was found for weak cytoplasmic immunostaining, where more OSCC cells displayed low cytoplasmic signal relative to the other groups ( $P < 0.001$ ). NOE samples displayed greater numbers of cells with strong and moderate cytoplasmic immunostaining relative to OSCC samples ( $P = 0.022$  and  $0.002$ , respectively). Regarding membrane marking, immunostaining was higher in OSCC compared with OED and NOE ( $P < 0.001$ ) (Table 2). There was a difference in strong and moderate membrane labeling between the gradations of OED ( $P = 0.002$  and  $0.001$ , respectively) (Table 3).

As shown in Table 4, we observed greater perinuclear signal in low-risk OED compared with OSCC ( $P = 0.029$ ). We also observed membrane signal that increased with the degree of malignant differentiation ( $P < 0.001$ ). Interestingly, there was a greater level of moderate membrane staining in high-risk OED samples compared with low-risk OED and control samples

( $P < 0.001$ ). Finally, greater levels of strong membrane signal in OSCC samples relative to controls was observed ( $P = 0.008$ ).

#### Ki-67

Analysis of Ki-67 revealed exclusive nuclear (nucleoplasm and nucleolus) immunostaining in both normal and dysplastic epidermoid cells of all evaluated specimens, with greater signal in the basal and parabasal layers of control samples (Figure 1).

The mean number of cells displaying nuclear Ki-67 was directly linked to the grade of cell non-differentiation ( $P < 0.001$ ), regardless of whether the signal was strong, moderate, or low staining ( $P < 0.001$ ) (Table 2). There was no difference in nuclear staining between the gradations of OED (Table 3). The average number of cells positive for Ki-67 was increased more significantly in the OSCC groups, followed by HRD, LRD (Low Risk Dysplasia), and control groups ( $P < 0.001$ ). This association was further confirmed by stronger nuclear staining in OSCC compared with LRD and control ( $P = 0.001$ ). Moderate staining was greater in OSCC compared with OED and controls ( $P < 0.001$ ). Finally, mild staining was greater in OSCC and HRD compared with the controls ( $P < 0.001$ ) (Table 4).

#### Correlations

To determine the possible interactions between the molecules studied and to better understand their functions and mechanisms of action in the OEDs and OSCCs, we built a diagram that shows a covariance structure model of the antitumor antibodies FoxO3a and p-JNK, as well as Ki-67 activation influenced by AKT in the cases of OSCC (Figure 2) and OED samples (Figure 3) of this research. The analyzed data were then further assessed using Pearson's correlation test.

#### Discussion

This immunohistochemical study was designed to understand and relate the carcinogenesis of OED and OSCC through the PI3K/AKT signaling pathway, which has been extensively investigated in the tumorigenesis process of multiple types of cancers, including OSCCs. However, few studies have approached the association of potentially malignant oral lesions with deregulation of this pathway.

#### p-JNK

In the samples we examined, specimens with dysplasia showed similar behavior to OSCC cases, with loss of nuclear p-JNK (Table 2). Nuclear p-JNK localization appears to be lost in the malignant lesion, as there were more cells with strong nuclear immunostaining in low-grade dysplasia compared with high-grade (Table 3). These findings lead us to assume that the lower nuclear levels of p-JNK in these samples are related to the regulation of tumorigenesis. Similar research using human gastric cancer specimens found greater nuclear staining of p-JNK during early clinical stages of the tumor, in patients with higher survival rates, and correlated inversely with lymphatic invasion (Choi *et al*, 2016). Despite these

Table 4 Mean and intensity of immunostained cells in membrane, cytoplasm, and nucleus of low- and high-risk oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma

Antibody/Staining	NOE	OED			P
		Low risk	High risk	OSCC	
p-AKT/nuclear	1.8 ± 4.7	9.71 ± 9.58	6.11 ± 6.25	21.2 ± 19.0 <sup>*†‡</sup>	0.005
p-AKT/perinuclear	14.3 ± 8.1	25.10 ± 8.06	15.25 ± 9.55	15.1 ± 9.5 <sup>†</sup>	0.029
p-AKT/strong cytoplasmic	14.9 ± 7.6	15.93 ± 10.59	16.36 ± 11.91	8.2 ± 6.8	0.055
p-AKT/moderate cytoplasmic	44.8 ± 9.5	34.12 ± 5.75	37.50 ± 10.41	28.2 ± 12.3 <sup>*</sup>	0.005
p-AKT/weak cytoplasmic	39.5 ± 10.9	45.60 ± 13.01	40.01 ± 11.43	59.9 ± 15.7 <sup>*†</sup>	0.001
p-AKT/negative cytoplasmic	0.8 ± 0.6	4.4 ± 2.8	6.1 ± 5.5 <sup>*</sup>	3.7 ± 3.3	0.047
p-AKT/strong membrane	0.0 ± 0.0	3.33 ± 4.37	16.92 ± 10.09	17.7 ± 19.7 <sup>*</sup>	0.008
p-AKT/moderate membrane	0.0 ± 0.0	11.60 ± 8.06	28.33 ± 9.64 <sup>*†</sup>	18.9 ± 11.9 <sup>*</sup>	<0.001
p-AKT/weak membrane	0.0 ± 0.0	17.65 ± 4.96	20.87 ± 9.91 <sup>*</sup>	52.6 ± 21.7 <sup>*†‡</sup>	<0.001
p-AKT/negative membrane	100.0 ± 0.0	67.4 ± 11.3 <sup>*</sup>	33.9 ± 20.8 <sup>*†</sup>	10.8 ± 11.5 <sup>*†‡</sup>	<0.001
Ki67/strong nuclear	1.9 ± 2.0	8.30 ± 7.51	15.33 ± 12.38	48.1 ± 49.6 <sup>*†</sup>	0.001
Ki67/weak nuclear	8.6 ± 3.1	12.26 ± 3.68	14.32 ± 4.02 <sup>*</sup>	16.3 ± 4.8 <sup>*</sup>	<0.001
Ki67/moderate nuclear	3.3 ± 1.2	6.87 ± 3.87	7.81 ± 2.57	20.2 ± 7.4 <sup>*†‡</sup>	<0.001
Ki67/nuclear	12.3 ± 4.1	23.79 ± 9.76	27.77 ± 8.34 <sup>*</sup>	54.6 ± 16.8 <sup>*†‡</sup>	<0.001
p-JNK/strong nuclear	48.3 ± 13.7	15.47 ± 11.33 <sup>*</sup>	6.50 ± 7.25 <sup>*</sup>	1.1 ± 1.3 <sup>*†</sup>	<0.001
p-JNK/weak nuclear	9.9 ± 7.6	29.35 ± 11.01	35.59 ± 12.61	49.8 ± 19.5 <sup>*†</sup>	<0.001
p-JNK/moderate nuclear	14.4 ± 10.8	22.17 ± 14.07	17.14 ± 17.16	17.7 ± 20.5	0.865
p-JNK/negative nuclear	27.5 ± 13.0	33.08 ± 15.50	40.78 ± 20.99	31.4 ± 14.3	0.415
p-JNK/strong cytoplasmic	0.1 ± 0.3	0.32 ± 0.28	0.51 ± 0.47	0.9 ± 1.0	0.166
p-JNK/weak cytoplasmic	21.5 ± 42.0	25.37 ± 23.37	24.67 ± 26.87	17.4 ± 16.5	0.787
p-JNK/moderate cytoplasmic	0.2 ± 0.4	2.09 ± 3.19	2.39 ± 4.20	1.8 ± 1.8	0.602
p-JNK/negative cytoplasmic	78.2 ± 41.8	72.22 ± 25.85	72.46 ± 28.87	80.0 ± 16.7	0.804
FoxO3a/strong nuclear	13.5 ± 4.8	4.39 ± 6.50 <sup>*</sup>	1.96 ± 4.04 <sup>*</sup>	0.0 ± 0.1 <sup>*†</sup>	<0.001
FoxO3a/weak nuclear	8.8 ± 2.6	21.25 ± 12.03 <sup>*</sup>	9.98 ± 9.02	3.3 ± 3.8 <sup>*†</sup>	<0.001
FoxO3a/moderate nuclear	68.6 ± 10.7	22.83 ± 13.08 <sup>*</sup>	8.76 ± 18.02 <sup>*†</sup>	0.6 ± 6.8 <sup>*†</sup>	<0.001
FoxO3a/negative nuclear	9.1 ± 3.6	51.51 ± 15.00 <sup>*</sup>	79.28 ± 26.71 <sup>*†</sup>	96.1 ± 4.3 <sup>*†‡</sup>	<0.001
FoxO3a/strong cytoplasmic	0.0 ± 0.0	18.58 ± 30.69	20.51 ± 36.24	5.0 ± 14.4	0.208
FoxO3a/weak cytoplasmic	10.0 ± 13.8	29.12 ± 18.39	10.33 ± 8.28	41.6 ± 27.0 <sup>*†</sup>	0.001
FoxO3a/moderate cytoplasmic	83.5 ± 10.6	26.87 ± 26.80 <sup>*</sup>	43.89 ± 43.81	46.4 ± 28.4	0.019
FoxO3a/negative cytoplasmic	6.5 ± 4.9	25.42 ± 22.42 <sup>*</sup>	25.27 ± 35.00 <sup>*</sup>	7.0 ± 8.8	0.040

NOE, normal oral epithelium; OED, oral epithelial dysplasia; OSCC, oral squamous cell carcinoma.

\*P < 0.05 vs NOE.

†P < 0.05 vs low-risk OED.

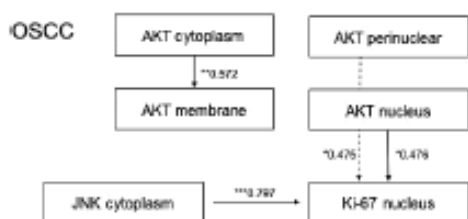
‡P < 0.05 vs high-risk OED; test: ANOVA/Bonferroni (media ± DP).

findings suggesting a protective role of p-JNK, Choi *et al* (2016) found, through cell culture experiments, that the inhibition of p-JNK reduced the expression of D1 cyclin proteins and limited colony formation. This indicated that the activation of p-JNK (Nuclear JNK) is at least partially required for cell growth and proliferation in the early stages of cancer. However, we must consider that p-JNK does not have a single target, such as cyclins, but a large number of downstream substrates that are mostly nuclear transcription factors, cytoplasmic proteins, and the mitochondrial membrane proteins (Wang *et al*, 2012). The tumor suppressor activity of JNK is closely related to its apoptotic function through a mitochondrial pathway (Davis, 2000), which can occur when p-JNK targets p53 by promoting its phosphorylation and subsequent accumulation and activation as a transcriptional regulator (Oleinik *et al*, 2007).

In this study, we did not observe differences in the p-JNK expression patterns in HRD and OSCC (Table 4), which led us to believe that malignant transformation of dysplasias may involve the same mechanisms of established malignant lesions. One possible explanation of this finding is that the cell has a fail-safe mechanism, which requires coordinated activity between JNK and P53

(Gowda *et al*, 2012). As P53 is often lost in OSCC and OEDs, the apoptosis may therefore not be induced by p-JNK, contributing to the oncogenic cellular transformation. This study did not conduct experiments with P53, which limited us to draw only theories to explain our results and not make greater conjectures. Further research seeking to analyze the cross-talk between P53 and p-JNK in the carcinogenesis process is therefore necessary.

Findings from previous work have demonstrated aberrant expression of JNK in many cancer cell lines, as well as in biopsy samples from patients with cancer (Hui *et al*, 2008; Chang *et al*, 2009; Barbarulo *et al*, 2013). This suggests that JNK may contribute to the cellular transformation required for carcinogenesis (Bubici and Papa, 2014), as the individual depletion of various subtypes of JNKs can suppress tumor activity depending on the specificity of the tissue (Wagner and Nebreda, 2009). The protumorigenic role of JNK in many types of cancer has led to increasing investigation into possible therapeutic avenues using this protein. However, inhibition of JNK can also be harmful (Bubici and Papa, 2014), as substantial evidence has implicated JNK as a tumor suppressor (Davis, 2000; Wagner and Nebreda, 2009). Thus, it is necessary to understand the molecular basis of the dual role



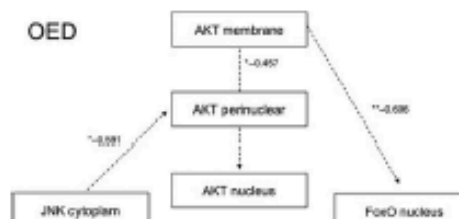
**Figure 2** Path diagram depicting the covariance structure model of OSCC immunostaining profile. Rectangles represent manifest (measured) variables. Single-headed arrows represent correlations between the immunostaining patterns. Numbers adjacent to arrows are standardized path coefficients. Variables on the left are assumed to be causally prior to those on the right. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$

of JNK in different tumors in order to validate the actual therapeutic potential of inhibiting it (Bubici and Papa, 2014). One possible explanation for the opposing pro- and anti-tumorigenic roles of JNK is the regulation of many specific cellular targets in different cancer types, although many of these target proteins remain still unknown (Bubici and Papa, 2014). Other variables that affect the level of complexity of JNK regulation in tumorigenesis include the stimulus for activation, duration of activation, and the context of its production (Du *et al.*, 2004).

#### FoxO3a

Here, we observed that the advance of malignance in dysplasias was accompanied by the gradual loss of nuclear FoxO3a immunostaining (Table 3), leading to similar qualitative immunostaining results as those observed in HRD and OSCCs (Table 4). The anti-tumor role of FoxO3a in OSCC has been previously demonstrated (Fang *et al.*, 2011a, 2011b; Chi *et al.*, 2015). Its nuclear localization is associated with decreased cell proliferation and increased apoptosis of tumor cells *in vitro*, as well decreased tumor size *in vivo* (Fang *et al.*, 2011a). Together with the results of the current work, these results suggest that the loss of nuclear FoxO3a is involved not only in established malignant lesions but also in the malignant transformation of oral dysplasia. To our knowledge, this is the first study that evaluates FoxO3a in the context of oral dysplasias.

However, recent research has shown an unexpected pro-tumorigenic role of FoxO, suggesting more complex activity of this protein in tumors (Hui *et al.*, 2008; Tenbaum *et al.*, 2012; Osuka *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2016). Here, through the analysis of FoxO3a expression *in situ*, we found no evidence of a possible pro-tumorigenic role of this protein in the samples examined. Previous work has demonstrated that in the early stages of a tumor, inactivating FoxO3a provides a proliferative advantage to neoplastic cells by increasing signaling through growth factor. In contrast, the later stages of tumor stress conditions, such as serum deprivation, hypoxia, and oxidative stress, can reactivate FoxO3a and thus increase the survival of tumor cells (Li *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2016). These data underpin the findings of the present study, allowing us to propose



**Figure 3** Path diagram depicting the covariance structure model of oral epithelial dysplasia immunostaining profile. Rectangles represent manifest (measured) variables. Single-headed arrows represent correlations between the immunostaining patterns. Numbers adjacent to arrows are standardized path coefficients. Variables on the left are assumed to be causally prior to those on the right. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

that the inactivation of FoxO3a in dysplasias (*i.e.*, early-stage malignant lesions) contributes in some way to their malignant progression. Furthermore, the inactivation of FoxO3a provides a proliferative advantage to OSCCs investigated in this study. Our samples were in the early stages of malignancy, as the sample was composed only of well-differentiated and moderately differentiated tumors, with no poorly differentiated cases. Thus, the role of FoxO3a in tumorigenesis is context dependent (Li *et al.*, 2012), as its activity is controlled differently in specific tissues in response to various external stimuli and intensities (Calnan and Brunet, 2008).

We observed a significant increase in weak cytoplasmic immunostaining in the OSCC group relative to the HRD group (Table 4). This may be due to a certain degree of protein degradation because FoxO can be ubiquitinated and degraded by cytoplasm proteasomes (Van der Heide *et al.*, 2004). In this study, cytoplasmic immunostaining of FoxO3a near the membrane was observed both in the control group and in the dysplasias and OSCC samples; however, this parameter was not measured.

#### p-AKT

The activity of Akt is modulated downstream of PI3K, and then, the protein is recruited to the sites of plasma membrane and phosphorylated at two sites by PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) (at Thr308, AKT1 residue) and mTORC2 (mammalian target of rapamycin) (Ser473, residue AKT1) (Nicholson and Anderson, 2002; Dillon and Muller, 2010). This leads to AKT activation, where phosphorylated AKT dissociates from the plasma membrane and phosphorylates its targets in the cytoplasm and nucleus (Dillon and Muller, 2010). The phosphorylation of these AKT targets is required for oncogenic transformation (Mende *et al.*, 2001). However, the selection of the substrate can be affected by AKT localization within the cell location (Dufner *et al.*, 1999), so it is therefore important to know the sub-cellular localization of this protein (Nicholson and Anderson, 2002). Our current study assessed the immunostaining of p-AKT at the membrane, cytoplasm, nucleus, and perinuclear regions. To our knowledge, this is the first study to evaluate activated AKT activated in the context of all levels of cellular location.

AKT1 does not efficiently transform cells in culture unless it is bound to the plasma membrane (Mirza *et al*, 2000; Sun *et al*, 2001). Thus, pathological association of AKT with the plasma membrane is a common thread that connects AKT with cancer (Carpten *et al*, 2007). Here, we observed that the presence of p-AKT at the membrane was proportional to the degree of malignancy of the dysplasia (Table 3). These results give us reason to believe that the malignant transformation process of oral lesions and oral cancer involves the AKT1 activation and that activation of this protein is essential in the early stages of malignant transformation of oral lesions.

Interestingly, when analyzing the intensity of immunostaining, we observed that the OSCC samples had a pattern of weak membrane immunostaining that was significantly higher than that seen in HRD and LRD (Table 4). We also observed light cytoplasmic immunostaining that was significantly higher in OSCC than in HRD and the controls (Table 4). This result could be due to AKT nuclear translocation, as this is part of its activation process (Noguchi *et al*, 2014) and leads to reduction of Akt levels at the plasma membrane and in the cytoplasm (Dillon and Muller, 2010). In addition, the most sensitive mechanism to reduce AKT activity is autophagy (Degtyarev *et al*, 2008). This finding leads us to suggest that the lower expression of AKT at the membrane and in the cytoplasmic found in this study might also be related to the induction of autophagy.

Autophagy has been implicated both in tumor suppression (Takamura *et al*, 2011; White, 2012) and in promoting tumor growth (White *et al*, 2012). The activation of AKT in the plasma membrane inhibits the autophagy induction and the AKT at the plasma membrane inhibits induction of autophagy, and translocation of AKT from the cytosol to lysosomes induces autophagy (Matsuda-Lemnikov *et al*, 2014; Noguchi *et al*, 2014). AKT1 and AKT2, but not AKT3, interact with the lysosomal protein Phafin2 (also known as EAPF or PLEKHP2). Furthermore, AKT-Phafin2 translocation to the perinuclear lysosomes has been implicated in autophagy (Matsuda-Lemnikov *et al*, 2014; Noguchi *et al*, 2014). The perinuclear immunostaining of p-AKT in this study was found to be significantly higher in the LRD samples than in OSCCs (Table 4). It was also significantly higher in LRD when compared to HRD (Table 3), suggesting the involvement of autophagolysosomes in inhibiting the PI3K-AKT pathway in the early stages of progression of malignancy. The lower cytoplasmic and membrane levels of p-AKT we found in OSCC may contribute to autophagy; however, no statistically significant differences in these levels were observed when compared to the control group (Table 4). This may be explained because in the present study, despite presenting data related to the pathological staging of OSCC, the choice of these cases may have been biased toward selection of lesions in early clinical stages, as we had limited access to the clinical assessments of the cases studied. Moreover, contrary to the methodology of Massarelli *et al* (2005), case controls in our current study did not exclude smoking and/or alcohol consumption. This may have influenced the immunohistochemical results, as previous cell culture experiments have shown that AKT activation occurs within a few minutes

of when cells are exposed to cigarette substances in concentrations similar to those occurring in the individual smoker (West *et al*, 2002).

#### Ki-67

Immunostaining with Ki-67 antibodies is well established as a quick and efficient method to evaluate the antiproliferative profile of neoplasias, as the protein binds to cells undergoing proliferation (Birajdar *et al*, 2014). In this study, Ki-67 immunohistochemical analysis revealed the protein exclusively in the nuclei of OSCC and OED cells, while in controls it was observed more commonly at the basal and parabasal layers. These findings corroborate the studies of Kobayashi *et al* (2010) and Hasegawa *et al* (2016), who suggested this protein as an important marker in the histopathologic scope of premalignant epithelial lesions. The presence of nuclear Ki-67 was significantly increased in OSCC compared with OED and the control (Table 2). It was also greater in OED samples compared with the control, revealing a direct relationship between Ki-67 immunoreactivity and the grade of malignant cell differentiation and proliferation (Birajdar *et al*, 2014; Hasegawa *et al*, 2016).

Birajdar *et al* (2014) reported that immunostaining for Ki-67 increases with proliferative cellular activity and OED degree, suggesting this protein as an important marker of for proliferation and for sorting/grading in the OED based on greater expression in the parabasal layers. In this study, we noted the same trend in the samples; however, Ki-67 expression did not differ between HRD and LRD (Table 3), regardless of the localization pattern. These findings lead us to believe that the lower level of Ki-67 seen in OED can be related to the state of proliferation and differentiation of OED. Kujan *et al* (2006) analyzed immunostaining of Ki-67 in HRD and LRD. The authors found lower levels in the basal, stratum spinosum and parabasal cell layers in LRD samples, while in the number of proliferating cells with positive staining for Ki-67 was higher in HRD, consistent with the degree of dysplasia.

This increased proliferation in parabasal layers of OED is probably related to loss of heterozygosity in 3p, 9p, and 17p, which serve markers of differentiation, and increases the risk of neoplasias (Tabor *et al*, 2003; Birajdar *et al*, 2014).

As seen in Figure 2, we observed that the presence of cytoplasmic AKT in OSCC was moderately but directly correlated with its membrane form. These findings are in agreement with the literature, as AKT activation begins at the membrane and carries out its various functions upon reaching the cytoplasm where it targets diverse substrates (Nicholson and Anderson, 2002; Gonzalez and McGraw, 2009; Dillon and Muller, 2010). Interestingly, we did not observe this association in OED samples (Figure 2), which leads us to suggest that the activation of AKT in these injuries could happen through a mechanism that does not involve the classic mode of AKT activation, that is, through its prior activation at the membrane. Recent studies have demonstrated that other kinases can interact with AKT and induce cellular transformation without requiring the PI3K signaling pathway (Mahajan *et al*, 2010; Guo

*et al*, 2011; Joung *et al*, 2011; Xie *et al*, 2011; Mahajan and Mahajan, 2012). Ser/Thr kinase I- $\kappa$ -B kinase epsilon (I $\kappa$ B $\kappa$ ) has the ability to activate AKT regardless of the PH domain and without requiring PI3K, mTORC2, or PDK1 (Guo *et al*, 2011; Xie *et al*, 2011). The non-receptor tyrosine kinase Ack I (activated CDC42-associated kinase 1) is able to recruit and activate AKT by inducing the phosphorylation of Tyr176 residue without necessitating PI3K activity (Mahajan *et al*, 2010). Additionally, TBK1 (TANK-binding kinase 1) interacts with and activates AKT in a PI3K-independent manner (Joung *et al*, 2011). Other kinases involved in this pathway include protein kinase 6, Src (cellular Src kinase), DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), and ATM (ataxia telangiectasia-mutated protein) (Mahajan and Mahajan, 2012).

As previously discussed, we found here that autophagy, denoted by the presence of perinuclear AKT (Matsuda-Lennikov *et al*, 2014; Noguchi *et al*, 2014), was primarily observed in OED (especially in LRD) rather than in the OSCC. Interestingly, Figure 2 shows that in OSCC, the cell autophagy process is directly related to increased cell proliferation, represented by immunostaining of Ki-67. This finding leads us to suggest a different role for autophagy in OSCC compared with that observed in OED, and it emphasizes that cell autophagy is context dependent (White *et al*, 2012). Similar research has found a direct association between markers related to autophagy and Ki-67 in breast cancer samples (Ueno and Mamounas, 2016). A link between nuclear AKT and greater cell proliferation rates is expected, as AKT targets certain nuclear substrates and its nuclear localization is a requirement for activation (Noguchi *et al*, 2014). The presence of nuclear p-AKT was found during similar studies of oropharyngeal squamous cell cancer, revealing a significant inverse correlation with the immunorexpression of nuclear PTEN (Yu *et al*, 2007).

Nuclear AKT immunostaining provided a strong and direct correlation with cytoplasmic JNK (Figure 2). A direct connection between JNK and the AKT pathway has not been found (Kim *et al*, 2001). However, the association between JNK and AKT appears to involve cross-talk with FoxO3a, as previously discussed. Furthermore, increased AKT activity may lead to suppression of the apoptotic activity of JNK (Kim *et al*, 2001; Fey *et al*, 2012), allowing its activity to be only proliferative (Fey *et al*, 2012). Kim *et al* (2001) found that Akt suppresses apoptotic activity of JNK through phosphorylation and subsequent inactivation of ASK1 (signal-regulating kinase 1), which is responsible for activating MKK4 (mitogen-activated protein kinase kinase 4) and MKK7 (mitogen-activated protein kinase kinase 7). The latter proteins are directly involved in activation of JNK. As previously discussed, we assume that in the tumor context of OSCC used here, nuclear AKT may be heavily involved in the relocation of JNK to the cytoplasm, thereby preventing it from acting on nuclear transcription factors that may have tumor suppressor role.

As shown Figure 3, we observed in OEDs a weak inverse correlation between the presence of membrane and nuclear AKT. As previously discussed, the nuclear

translocation of AKT reduces its levels at the membrane and in the cytoplasm, affecting the phosphorylation of substrates in these cellular compartments (Dillon and Muller, 2010). Nuclear translocation also increases its influence on specific nuclear targets, generating, among other things, progression of the cell cycle and suppression of apoptosis (Martelli *et al*, 2012). Despite not knowing exactly how AKT enters the nucleus (Martelli *et al*, 2012), it is important to note here is we identified its nuclear localization in OEDs and in OSCCs, with statistically significant differences between the two (Table 2). The presence of nuclear AKT is found in several types of cancer, such as lung (Lee *et al*, 2002), breast (Nicholson *et al*, 2003), thyroid (Vasko *et al*, 2004), prostate (Van de Sande *et al*, 2005) and invasive cellular carcinomas of the head and neck (Giudice *et al*, 2011). Here, we also found nuclear AKT in premalignant lesions in this study, which leads us to suggest that AKT in the nucleus is involved in the process of malignant transformation cell.

Cytoplasmic localization of JNK had a moderate inverse correlation with perinuclear localization of AKT (Figure 3). As previously noted, although a direct connection between AKT and JNK has not yet been found (Kim *et al*, 2001), we can suggest based on this finding that the process of cellular autophagy, indicated by the presence of AKT perinuclear (Matsuda-Lennikov *et al*, 2014; Noguchi *et al*, 2014), is connected with the reduction of cytoplasmic JNK. Zhou *et al* (2015) previously warned about the need to investigate the cross-talk between the JNK pathway and other autophagic signaling pathways. Additional research has found that cytoplasmic and nuclear JNK are involved in cell autophagy (Mehrpour *et al*, 2010). However, according to Zhou *et al* (2015), the JNK signaling pathway is extremely complicated and little is known about its role in autophagy.

Membrane localization of AKT was moderately inversely correlated with the presence of nuclear FoxO3a (Figure 3). These results are consistent with those reported in the literature, as the phosphorylation and subsequent activation of AKT result in the sequestration of FoxO away from the nucleus in the cytoplasm (Van der Heide *et al*, 2004). Thus, as seen in the present work, the loss of nuclear FoxO3a and with its subsequent relocation to the cytoplasm shows a process involved in the malignant transformation of the OED.

In conclusion, we emphasize that this study has limitations because it is based solely on immunohistochemistry, and this technique can only assess protein expression and not the mRNA. However, using this method, we conclude that the malignant transformation process of the OED investigated here may involve the same mechanisms as established malignant lesions. Furthermore, the cellular localization of the proteins investigated has a direct role in their functions within the tumor microenvironment. This is especially true for the antitumorogenic activity of p-JNK and FoxO3a in both OEDs and OSCCs. Lastly, we found autophagy to be dependent on the context, based on a direct correlation between autophagy and cell proliferation only in cases of OSCC. This allowed us to conclude that in these cases, autophagy has a pro-tumorogenic role.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. The authors would like to acknowledge Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, Brazil.

### Author Contributions

Rilipe Nobre Chaves and Tháimara Manoela Marinho Bezerra performed histochemical and immunohistochemical reactions and writing of the paper. They read and approved the final version. Paulo Góberlino de Barros Silva was responsible for statistical analysis. He read and approved the final version. Francisco Artur Forte Oliveira was responsible for review of the statistical analysis and writing of the paper. They read and approved the final version. Fabrício Bini Sousa and Fábio Wildson Gurgel Costa were responsible for the pathological study design, review text and writing of the paper. They read and approved the final version. Kamza Maria Alves Pereira and Ana Paula Negreiros Nunes Alves designed the experiments, reviewed the text and read and approved the final version.

### References

Ayala FR, Rocha RM, Carvalho KC *et al* (2010). GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for oral squamous cell carcinoma. *Molecules* 15: 2374–2387.

Barbantano A, Iansante V, Chaidos A *et al* (2013). Poly(ADP-ribose) polymerase family member 14 (PARP14) is a novel effector of the JNK2-dependent pro-survival signal in multiple myeloma. *Oncogene* 32: 4231–4242.

Bames L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D (2005). *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours*. IARC: Lyon, pp. 209–253.

Birajdar SS, Radhika MB, Pareek K, Sudhakara M, Soumya M, Gadivan M (2014). Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol* 18: 169–176.

Bubici C, Papa S (2014). JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 171: 24–37.

Calnan DR, Bunnet A (2008). The FoxO code. *Oncogene* 27: 2276–2288.

Capten JD, Faber AL, Horn C *et al* (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448: 439–444.

Chang Q, Zhang Y, Beerhold KJ *et al* (2009). Sustained JNK1 activation is associated with altered histone H3 methylations in human liver cancer. *J Hepatol* 50: 323–333.

Chi H (2015). miR-194 regulated AGK and inhibited proliferation of oral squamous cell carcinoma by reducing PI3K-Akt-FoxO3a signaling. *Biomol Pharmacother* 71: 53–57.

Choi BY, Choi HS, Ko K *et al* (2005). The tumor suppressor p16<sup>INK4a</sup> prevents cell transformation through inhibition of c-Jun phosphorylation and AP-1 activity. *Nat Struct Mol Biol* 12: 699–707.

Choi Y, Paik J, Choi Y *et al* (2016). c-Jun N-terminal kinase activation has a prognostic implication and is negatively associated with FOXO1 activation in gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 16: 59.

Davis RJ (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239–252.

Degtyarev M, De Maziere A, Orr C *et al* (2008). Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *J Cell Biol* 183: 101–116.

Dillon RL, Muller WJ (2010). Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res* 70: 4260–4264.

Du L, Lyle CS, Obey TB *et al* (2004). Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity: evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. *J Biol Chem* 279: 11957–11966.

Dufner A, Andjelkovic M, Burgeting BM, Hemmings BA, Thomas G (1999). Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19: 4525–4534.

Eckert AW, Lautner MH, Schütze A, Taubert H, Schubert J, Bilkenroth U (2011). Coexpression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopathology* 58: 1136–1147.

Fang L, Wang H, Zhou L, Yu D (2011a). AKT-FOXO3a signaling axis dysregulation in human oral squamous cell carcinoma and potent efficacy of FOXO3a-targeted gene therapy. *Oral Oncol* 47: 16–21.

Fang L, Wang H, Zhou L, Yu D (2011b). FOXO3a reactivation mediates the synergistic cytotoxic effects of ramiprillin and cisplatin in oral squamous cell carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 251: 8–15.

Fey D, Cosscher DR, Kolch W, Kholodenko BN (2012). Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Front Physiol* 3: 355.

Fillies T, Werkmeister R, van Diest PJ, Brandt B, Joos U, Bueger H (2005). HIF1 $\alpha$  overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer* 5: 84.

Giudice FS, Squarize CH (2013). The determinants of head and neck cancer: unmasking the PI3K pathway mutations. *J Carcinog Mutagen Suppl* 5: 003. doi:10.4172/2157-2518.S5-003.

Giudice FS, Dal Vecchio AMD, Abmhao AC, Spemiano FF, Pinto DD (2011). Different expression patterns of pAkt, NR $\alpha$  and cyclin D1 proteins during the invasion process of head and neck squamous cell carcinoma: an in vitro approach. *J Oral Pathol Med* 40: 405–411.

Gonzalez E, McGraw TE (2009). The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8: 2502–2508.

Gowda PS, Zhou F, Chadwell LV, McEwen DG (2012). p53 binding prevents phosphatase-mediated inactivation of diphosphorylated c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 287: 17554–17567.

Gao JP, Coppola D, Cheng JQ (2011). IKK $\beta$  protein activates Akt independent of phosphatidylinositol 3-kinase/PDK1/mTORC2 and the pleckstrin homology domain to sustain malignant transformation. *J Biol Chem* 286: 37389–37398.

Hasegawa M, Cheng J, Maniyama S *et al* (2016). Differential immunohistochemical expression profiles of perlecan binding growth factors in epithelial dysplasia, carcinoma in situ, and squamous cell carcinoma of the oral mucosa. *Pathol Res Pract* 212: 426–436.

Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner EF (2008). Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J Clin Invest* 118: 3943–3953.

Joung SM, Park ZY, Rani S, Takeuchi O, Akira S, Lee JY (2011). Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1. *J Immunol* 186: 499–507.

- Kim DK, Cho ES, Seong JK, Um HD (2001). Adaptive concentrations of hydrogen peroxide suppress cell death by blocking the activation of SAPK/JNK pathway. *J Cell Sci* 114: 4329–4334.
- Kobayashi T, Maniyama S, Cheng J et al (2010). Histopathological varieties of oral carcinoma in situ: diagnosis aided by immunohistochemistry dealing with the second basal cell layer as the proliferating center of oral mucosal epithelia. *Pathol Int* 60: 156–166.
- Knäuper-Lösler B, Flören C, Strömman U, Joos U, Meyer U (2005). Histologic, histomorphometric and immunohistologic changes of the gingival tissues immediately following mandibular osteodistraction. *J Clin Periodontol* 32: 98–103.
- Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Solan P (2006). Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* 42: 987–993.
- Lam EW, Francis RE, Petkovic M (2006). FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochem Soc Trans* 34: 722–726.
- Lee SH, Kim HS, Park WS et al (2002). Non-small cell lung cancers frequently express phosphorylated Akt; an immunohistochemical study. *APMIS* 110: 587–592.
- Li Z, Zhang H, Chen Y, Fan L, Fang J (2012). Forkhead transcription factor FOXO3a protein activates nuclear factor kappaB through B-cell lymphoma/leukemia 10 (BCL10) protein and promotes tumor cell survival in serum deprivation. *J Biol Chem* 287: 17737–17745.
- Mahajan K, Mahajan NP (2012). PI3K-independent AKT activation in cancer: a treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol* 227: 3178–3184.
- Mahajan K, Coppola D, Challa S et al (2010). Akt1 mediated AKT/PKB tyrosine 176 phosphorylation regulates its activation. *PLoS One* 5: e9646.
- Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D et al (2012). The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta* 1823: 2168–2178.
- Massarelli E, Liu DD, Lee JJ et al (2005). Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer* 104: 2430–2436.
- Matsuda-Lennikov M, Suizu F, Hirata N et al (2014). Lysosomal intension of Akt with Phafin2: a critical step in the induction of autophagy. *PLoS One* 9: e79795.
- Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res* 20: 748–762.
- Mende I, Malmström S, Tschlis PN, Vogt PK, Aoki M (2001). Oncogenic transformation induced by membrane-targeted Akt2 and Akt3. *Oncogene* 20: 4419–4423.
- Mirza AM, Kohn AD, Roth RA, McMahon M (2000). Oncogenic transformation of cells by a conditionally active form of the protein kinase Akt/PKB. *Cell Growth Differ* 11: 279–292.
- Mourao RV, Junior EC, Barros Silva PG (2016). Study of the relationship between mononuclear inflammatory infiltrate and Ki-67 and basement membrane and extracellular matrix protein expression in nodular cysts. *Int Endod J* 49: 447–453.
- Nicholson KM, Anderson NG (2002). The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14: 381–395.
- Nicholson KM, Struelli CH, Anderson NG (2003). Autocrine signaling through erbB receptors promotes constitutive activation of protein kinase B/Akt in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 81: 117–128.
- Noguchi M, Himita N, Suizu F (2014). The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1846: 342–352.
- Oleinik NV, Krupenko NI, Krupenko SA (2007). Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway. *Oncogene* 26: 7222–7230.
- Onaka S, Sampetean O, Shimizu T et al (2013). IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* 31: 627–640.
- Scully C, Bagan J (2009). Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol* 45: 301–308.
- Sun M, Wang G, Paciga JE et al (2001). AKT1/PKBa kinase is frequently elevated in human cancer and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 159: 431–437.
- Tabor MP, Brakhuis BJ, van der Wal JE et al (2003). Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oro pharynx. *J Pathol* 199: 354–360.
- Takamizu A, Komatsu M, Hara T et al (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 25: 795–800.
- Tenbaum SP, Ordonez-Moran P, Puig I et al (2012). Beta-catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nat Med* 18: 892–901.
- Ueno NT, Mamounas EP (2016). Neoadjuvant nab-paclitaxel in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 156: 427–440.
- Van de Sande T, Roskams T, Lerut E et al (2005). High-level expression of fatty acid synthase in human prostate cancer tissues is linked to activation and nuclear localization of Akt/PKB. *J Pathol* 206: 214–219.
- Van der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 380: 297–309.
- Vasconcelos MG, Vasconcelos RG, Oliveira DHIP, Santos EM, Silveira EJD, Queiroz LMG (2015). Distribution of hypoxia-inducible factor-1a and glucose transporter-1 in human tongue cancer. *J Oral Maxillofac Surg* 73: 1753–1760.
- Vasko V, Saji M, Hasty E et al (2004). Akt activation and localization correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet* 41: 161–170.
- Wagner EF, Nebreda AR (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9: 537–549.
- Wang H, Yang YB, Shen HM, Gu J, Li T, Li XM (2012). ABT-737 induces Bim expression via JNK signaling pathway and its effect on the radiation sensitivity of HeLa cells. *PLoS One* 7: e52483.
- Wamakulasuriya S (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 45: 309–316.
- Wamakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E (2008). Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 37: 127–133.
- West KA, Castillo SS, Dennis PA (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* 5: 234–248.
- White E (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 12: 401–410.
- Xie X, Zhang D, Zhao B et al (2011). IkappaB kinase epsilon and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 6474–6479.
- Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C et al (2007). Phosphorylation of Akt (Ser473) predicts poor clinical outcome in



378

- oropharyngeal squamous cell cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 553-558.
- Yu S, Yu Y, Zhang W *et al* (2016). FOXO3a promotes gastric cancer cell migration and invasion through the induction of cathepsin L. *Oncotarget* 7: 34773-34784.
- Zhou J, Xu G, Ma S *et al* (2015). Catalpol ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and adipose tissue inflammation by suppressing the JNK and NF- $\kappa$ B pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 467: 853-858.

#### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1** Analysis of covariance between the pattern of immunostaining in oral epithelial dysplasia (OED), oral squamous cell carcinoma (OSCC) and normal oral epithelium (NOE).

**ANEXO E: Certificação de língua inglesa do artigo 01 (Evaluation of the p-AKT, p JNK and FoxO3a function in the oral epithelial dysplasia malignance)**



AMERICAN JOURNAL EXPERTS

## EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

**Manuscript title:**

Evaluation of the p-AKT, p-JNK and FoxO3a function in the oral epithelial dysplasia malignance.

**Authors:**

Filipe Nobre Chaves, Thâmara Manoela Bezerra Marinho, Paulo Goberlânio de Barros Silva, Francisco Artur Forte Oliveira, Fabrício Bitu Sousa, Fábio Wildson Gurgel Costa, Ana Paula Negreiros Nunes Alves, Karuza Maria Alves Pereira

**Date Issued:**

October 12, 2016

**Certificate Verification Key:**

C444-3807-A727-C8C4-0DE4



This certificate may be verified at [www.aje.com/certificate](http://www.aje.com/certificate). This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at [support@aje.com](mailto:support@aje.com).

American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit [www.aje.com](http://www.aje.com).