



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**CAROLINA MAIA RODRIGUES**

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PTEN E p-AKT EM QUEILITES  
ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO**

**FORTALEZA**

**2022**

CAROLINA MAIA RODRIGUES

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PTEN E p-AKT EM QUEILITES  
ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Carcinogênese.

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

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Thâmara Manoela Marinho Bezerra.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- R612 Rodrigues, Carolina Maia.  
Análise da imunexpressão de PTEN e p-AKT em queilites actínicas e carcinomas epidermóides de lábio / Carolina Maia Rodrigues. – 2022.  
9 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira .  
Coorientação: Profa. Dra. Thâmara Manoela Marinho Bezerra.
1. Ceratose actínica. 2. Carcinoma de Células Escamosas. 3. PTEN Protein. 4. Proteína c-akt. 5. Imuno-Histoquímica. I. Título.

CDD 611

---

CAROLINA MAIA RODRIGUES

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PTEN E p-AKT EM QUEILITES  
ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Carcinogênese.

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

Coorientadora: Dr<sup>ª</sup>. Thâmara Manoela Marinho Bezerra.

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karuza Maria Alves Pereira (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>ª</sup>. Thâmara Manoela Marinho Bezerra (Coorientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Filipe Nobre Chaves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ealber Carvalho Macedo Luna  
Faculdade Luciano Feijão (FLF)

À minha doce e amada Catarina, que foi minha maior companheira em todas as viagens, idas e vindas à Fortaleza para a concretização de mais essa etapa da minha vida acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua infinita misericórdia, que me abençoa com todo o seu amor.

Aos meus pais, Nina e Paulo, meus maiores incentivadores, que sempre me acolhem e me mostram os caminhos a seguir. Vocês sempre serão meu porto seguro.

Aos meus irmãos, Caio e Abner, que são uns dos meus maiores exemplos de dedicação aos estudos. Espero que eu possa ser para o Miguel o exemplo que vocês são para mim.

Ao meu esposo, Aduino Filho, que mesmo seguindo áreas tão distintas, me apoia e me incentiva ao caminho da pós-graduação, compartilhando comigo as dificuldades encontradas.

Aos meus sogros, Aduino Custódio e Cosminha e à minha cunhada, Sarah, pelo amparo, apoio e atenção durante meus vários momentos de ausência.

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Karuza Maria Alves Pereira, por ter me acolhido desde o terceiro semestre da graduação e por ter sido fundamental para a construção do caminho da docência o qual sigo atualmente. Sou muito grata pela sua confiança e credibilidade!

À querida Thâmara, que além de coorientadora é uma amiga sempre presente. Sou sua fã em todos os aspectos de vida: pesquisadora, professora, mãe, esposa, filha e irmã. Sua inteligência é admirável! Sou grata por todos os ensinamentos transmitidos e por todas as horas dedicadas ao nosso trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roberta Cavalcante e ao Laboratório de Patologia Bucal da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) que gentilmente nos cederam as amostras para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Filipe Nobre Chaves, pela disponibilidade e enriquecimento deste trabalho na qualificação e na defesa. Agradeço também ao Dr. Ealber Carvalho Macêdo Luna pela disponibilidade em participar da banca avaliadora da defesa.

Aos amigos Sthefane e Denis, que prontamente e de maneira tão criteriosa, nos ajudaram e se dedicaram à realização dessa pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais pelos conhecimentos compartilhados ao longo desses anos. Agradeço também ao corpo técnico do PCMF representado pela Laísa por todos os esclarecimentos prestados.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para minha caminhada ao longo dos últimos anos e conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada!

Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazer.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.  
Ricardo Reis (heterônimo de Fernando  
Pessoa).

## RESUMO

A queilite actínica (QA) é uma desordem potencialmente maligna que acomete com maior frequência o vermelhão do lábio inferior, sendo caracterizada por alterações epiteliais e de tecido conjuntivo causadas pela exposição crônica à radiação solar ultravioleta (UV). A QA tem sido associada como uma condição de risco para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de lábio (CECL), o qual representa de 12% de todos os tumores de cabeça e pescoço. A radiação UV é capaz de causar danos ao DNA, mutações em genes supressores tumorais, alterações no ciclo celular e proliferação celular desordenada, o que leva a alterações displásicas e o desenvolvimento do CECL. Pesquisas recentes, sobre o processo de carcinogênese labial, buscam identificar biomarcadores capazes de melhor entender o desenvolvimento desse processo, que possua capacidade de predizer o prognóstico do CECL bem como fatores preditores da QA com maior potencial de transformação maligna. A via de sinalização celular PTEN/PI3K/AKT, uma das mais mutadas em câncer oral, pode também estar envolvida no processo de carcinogênese do câncer de lábio. Dessa forma, constitui objetivo dessa pesquisa avaliar a imunopressão de PTEN e da oncoproteína p-AKT em displasias epiteliais (DEs), oriundas de lesões de QA, e em CECLs. Foram selecionados 45 blocos parafinados, referentes a 25 biópsias incisionais de QAs e 20 biópsias incisionais de CECLs. Os resultados sociodemográficos mostram que a maioria dos pacientes com QA era do sexo masculino (n=20; 80%) e com faixa etária superior a 4ª década de vida (n = 21; 84%). A maioria dos pacientes com CECL eram do sexo masculino (n=13; 65%) e com idade superior a 40 anos (n = 20; 100%). Destes, 6 pacientes (30%) trabalhavam em ambiente com exposição solar crônica e contínua. Relativo as características histomorfológicas, grande parte das QAs apresentaram DE leve (n = 14; 56%) e 11 (55%) CECLs bem diferenciados. A imunomarcção de PTEN não revelou significância estatística nas diferentes sublocalizações celulares analisadas entre QAs e CECLs, segundo o teste de Mann-Whitney. Não foi detectado significância estatística (teste de Mann-Whitney e teste T pareado) entre as gradações histopatológicas de malignidade (GHMs) das DEs e CECLs com as diferentes sublocalizações celulares de PTEN e p-AKT. Houve maior quantidade de imunomarcção citoplasmática de PTEN do que nuclear em QAs (p = 0,0008) (teste T pareado) e CECLs (p < 0,0001) (teste T pareado). Um significativo aumento de p-AKT citoplasmático foi detectado em CECLs quando comparado com QAs (p = 0,0017) (teste T pareado). Uma maior quantidade de p-AKT citoplasmático do que nuclear foi detectado em CECLs (p < 0,0001) (teste de Mann-Whitney).



Nossos achados trazem evidências do possível papel de PTEN e p-AKT no processo de carcinogênese de lábio. Palavras-chave: Ceratose actínica; Carcinoma de Células Escamosas; PTEN Protein; Proteína c-akt; Imuno-Histoquímica.

## ABSTRACT

Actinic cheilitis (AC) is a potentially malignant disorder that most often affects the vermilion of the lower lip, characterized by epithelial and connective tissue changes caused by chronic exposure to ultraviolet (UV) solar radiation. AC has been associated as a risk condition for the development of squamous cell carcinoma of the lip (SCCL), which represents 12% of all head and neck tumors. UV radiation is capable of causing DNA damage, mutations in tumor suppressor genes, changes in the cell cycle and disordered cell proliferation, which leads to dysplastic alterations and the development of SCCL. Recent research on the process of lip carcinogenesis seeks to identify biomarkers capable of better understanding the development of this process, which have the ability to predict the prognosis of SCCL as well as predictors of AC with greater potential for malignant transformation. The PTEN/PI3K/AKT cell signaling pathway, one of the most mutated in oral cancer, may also be involved in the carcinogenesis process of lip cancer. Thus, the objective of this research is to evaluate the immunoeexpression of PTEN and p-AKT oncoprotein in epithelial dysplasias (EDs), arising from AC lesions, and in SCCLs. 45 paraffin-embedded blocks were selected, referring to 25 incisional biopsies of ACs and 20 incisional biopsies of SCCLs. The sociodemographic results show that most patients with AC were male (n=20; 80%) and aged over the 4th decade of life (n=21; 84%). Most patients with SCCL were male (n=13; 65%) and aged over 40 years (n=20; 100%). Of these, 6 patients (30%) worked in an environment with chronic and continuous sun exposure. Regarding the histomorphological characteristics, most of the ACs presented mild ED (n = 14; 56%) and 11 (55%) well-differentiated SCCLs. PTEN immunostaining did not reveal statistical significance in the different cellular sublocalizations analyzed between ACs and SCCLs. No statistical significance was detected between the histopathological grades of malignancy (GHMs) of EDs and SCCLs with the different cellular sublocalizations of PTEN and p-AKT. There was a greater amount of PTEN cytoplasmic immunostaining than nuclear immunostaining in ACs ( $p = 0.0008$ ) and SCCLs ( $p < 0.0001$ ). A significant increase in cytoplasmic p-AKT was detected in SCCLs when compared to ACs ( $p = 0.0017$ ). A greater amount of cytoplasmic than nuclear p-AKT was detected in SCCLs ( $p < 0.0001$ ). Our findings provide evidence for the possible role of PTEN and p-AKT in the process of lip carcinogenesis.

**Keywords:** Actinic cheilitis; Carcinoma; Squamous Cell; Precancerous Conditions; PTEN; Oncogene Protein v-akt; Immunohistochemistry.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1</b>	Queilite actínica.....	11
<b>1.2</b>	Carcinoma espinocelular de lábio.....	15
<b>1.3</b>	PTEN .....	16
<b>1.4</b>	AKT.....	18
<b>2.</b>	<b>PROPOSIÇÕES</b> .....	21
<b>2.1</b>	Objetivo geral.....	21
<b>2.2</b>	Objetivos específicos.....	21
<b>3.</b>	<b>CAPÍTULO</b> .....	22
<b>3.1</b>	Capítulo 1 .....	23
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Queilite Actínica

A queilite actínica (QA) é amplamente reconhecida como uma desordem potencialmente maligna ocasionada pela exposição prolongada e crônica ao sol (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012a). Os raios solares ultravioleta (UV) são espectros de radiações os quais são divididos em três comprimentos de ondas: UVA (320 a 400nm), UVB (280 a 320nm) e UVC (200 a 280nm). Cada espectro é responsável por um tipo específico de intensidade da radiação e conseqüentemente de dano aos organismos vivos (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 2005). Por se tratar de uma radiação de onda curta, a radiação UVC é quase que totalmente absorvida pela camada de ozônio, chegando à superfície terrestre em pequenas quantidades. A radiação UVA possui maior facilidade de alcançar a derme, ocasionando pigmentação da pele e provocando o efeito de bronzeado pelo escurecimento da melanina em um processo de foto oxidação da leucomelanina (SILVA; OGAWA; SOUZA, 2017). A radiação UVB, também pode ser responsável por lesões crônicas na pele, como eritema, edema, pigmentação cutânea, espessamento da derme e epiderme, catarata, supressão no sistema imunológico e mutações gênicas que levam ao câncer de pele (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 2005). Os raios UVB proporcionam mudanças não naturais e muitas vezes irreversíveis aos queratinócitos e melanócitos, uma vez que possuem efeito cumulativo (KÜTTING; DREXLER, 2010; RODRIGUES; MARTIN; MORAES, 2016).

A ocorrência da QA é dependente da soma de diversos fatores: dose de radiação a qual o indivíduo foi exposto, idade, predisposição genética, latitude geográfica, ocupação laboral, cor da pele, atividades de lazer e uso de agentes protetores labiais (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012a). O efeito sinérgico de agentes carcinogênicos como tabaco e consumo de álcool no processo de carcinogênese labial permanece incerto. Para alguns pesquisadores a exposição à radiação UV realmente é a principal responsável pelo desenvolvimento da QA e carcinoma espinocelular de lábio (CECL), sendo hábitos comportamentais fatores etiológicos secundários (ZINI; CZERVINSKI; SGAN-COHEN, 2010).

A melanina confere proteção natural contra os raios solares UV, logo o lábio inferior de indivíduos de pele clara se torna o principal sítio de acometimento da QA (PIÑERA-MARQUES et al., 2010). O lábio inferior costuma ser mais acometido do que o superior devido sua posição anatômica na face favorecer maior recebimento de radiação UV

(CHOQUET et al., 2020). Diferentemente da pele, os lábios são mais susceptíveis aos danos ocasionados pela radiação UV, pois, por estarem localizados numa área de transição entre a mucosa oral e a pele, possuem epitélio mais delgado, levemente queratinizado, tecido conjuntivo subjacente ricamente capilarizado, menos glândulas sebáceas, melanina e ausência de glândulas sudoríparas (VIEIRA et al., 2012; BOTA; LYONS; CARROLL, 2017).

Clinicamente, a QA se apresenta de duas formas: aguda e crônica. A forma aguda é caracterizada por edema e eritema brandos, fissuras e/ou úlceras graves, e ocorre quando há exposição excessiva ao sol num curto espaço de tempo. Frequentemente, acontece a resolução dessas alterações clínicas. A forma crônica advém da exposição prolongada e cumulativa aos raios solares UV, com alterações epiteliais irreversíveis. A apresentação clínica mais comum exhibe lábios ressecados, com fissuras, aumento de volume discreto e difuso, perda do limite entre mucosa labial e pele, além de pápulas e/ou manchas leucoplásicas (CINTRA et al., 2013; DE SANTANA et al., 2014; PICASCIA; ROBINSON, 1987) (Figura 1).

**Figura 1.** Aspectos clínicos da QA. **A:** Regiões atróficas com apagamento dos limites entre vermelhão do lábio e epitélio. **B:** Áreas leucoplásicas e pigmentadas no lábio inferior. **C:** Lesões ulceradas, em crosta e leucoplásicas no vermelhão do lábio. Observa-se também a presença de edema e apagamento dos limites entre vermelhão do lábio e epitélio. **D:** Presença de uma exuberante úlcera na região central do lábio inferior de borda leucoplásica.

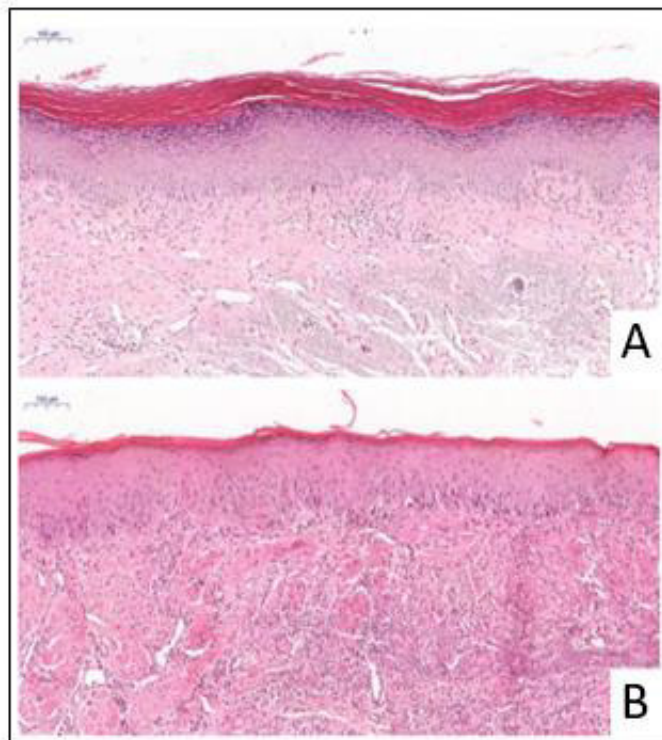


**Fonte:** Adaptado de Silva et al. (2020).

Histologicamente o epitélio da QA possui aspectos que variam desde hiperqueratose, variados graus de displasia epitelial (DE) até carcinoma *in situ*. A hiperplasia, acantose e atrofia também são alterações epiteliais frequentemente presentes (DANCYGER et al., 2018). A lâmina própria mostra vasos sanguíneos muitas vezes dilatados e proeminentes, além de infiltrado inflamatório de intensidade variada e elastose solar no tecido conjuntivo (DANCYGER et al., 2018). Alguns estudos apontam a elastose solar como um achado histopatológico constante e o mais consistente em QAs (MARKOPOULOS; KAYAVIS, 2004; DE SANTANA et al., 2014). A elastose solar reflete os danos solares ao tecido, sendo um importante fator no desenvolvimento da QA, sem, entretanto, ser preditivo para evolução da QA para CECL (ARNAUD et al., 2014).

Para facilitar o manejo do paciente, foram propostos sistemas de gradação para DE. Segundo a OMS (2017), a DE pode ser caracterizada como leve, moderada ou severa, de acordo com o grau do comprometimento dos estratos epiteliais pelas alterações citológicas e arquiteturais presentes. No entanto, esse sistema isoladamente não pode prever o prognóstico do paciente e é considerado subjetivo pelos patologistas (CÂMARA et al., 2016). Kujan et al. (2006) propuseram um sistema de gradação binária para gradar a DE com o objetivo de minimizar a subjetividade da análise. Esse novo sistema preconiza a divisão das lesões em dois subgrupos de acordo com o risco de transformação maligna (baixo e alto risco) (Figura 2).

**Figura 2:** Imagens histológicas de DEs de lábio segundo o sistema binário de gradação histopatológica. **A:** DE de baixo risco representada por hiperqueratose com falta de polarização da camada basal, variações no tamanho e formato do núcleo e hiperchromatismo (H&E, 6X). **B:** DE de alto risco representada por estratificação epitelial irregular, perda de polaridade das células da camada basal, cristas epiteliais em forma de gota e perda da coesão das células epiteliais. Além disso, nota-se variação no tamanho e formato nuclear e celular, hiperchromatismo e perda da relação núcleo/citoplasma (H&E, 2X). Em ambas as imagens é possível observar a degeneração basofílica das fibras colágenas (elastose solar) no tecido conjuntivo.



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2020).

Nankivell et al. (2013) compararam a reprodutibilidade e a capacidade prognóstica entre esse sistema binário e aquele preconizado pela OMS (BARNES et al., 2005) utilizando 141 biópsias de DEs orais (DEOs). O sistema binário mostrou concordância superior aquele da OMS bem como capacidade prognóstica semelhante em ambos. A revisão sistemática e meta-análise de YAN et al. (2020) também concluiu que a classificação binária de DEOs em categorias de baixo e alto risco pode efetivamente determinar o potencial de malignidade, com melhor concordância entre os observadores em relação à classificação de três níveis. Dessa forma, esse tipo de sistema de gradação vem sendo bastante utilizado em pesquisas recentes (CHAVES et al., 2017; CHAVES et al., 2019).

O tratamento de escolha para a QA deve levar em consideração o diagnóstico histológico, a experiência do cirurgião-dentista, aspectos estéticos e possíveis efeitos colaterais (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012B). A terapêutica recomendada para a QA envolve tratamentos invasivos e não invasivos. A vermelhectomia é a técnica cirúrgica mais comumente empregada, porém pode ser associada a complicações como cicatrizes, edema persistente, reepitelização tardia, infecção secundária e disestesia (DE PERES et al., 2009; CASTIÑEIRAS et al., 2010). Terapias convencionais, como a farmacoterapia tópica, a terapia fotodinâmica, a crioterapia e a ablação a *laser* de CO<sub>2</sub> são cada vez mais utilizadas para o tratamento da QA. Os tratamentos não cirúrgicos são menos invasivos e têm menos efeitos secundários do que as terapias



cirúrgicas. (VIEIRA et al., 2012; DE CARVALHO et al., 2019). Bakirtzi e colaboradores (2021) mostraram que as terapias invasivas, como cirurgias parciais e tratamentos a laser, tiveram os melhores resultados estéticos e terapêuticos com poucas recorrências. A terapia fotodinâmica demonstrou resultados satisfatórios, enquanto os tratamentos tópicos foram os menos benéficos.

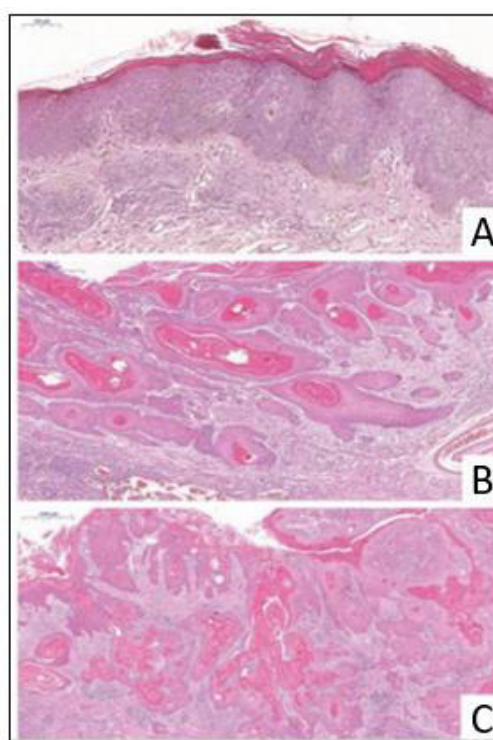
## **1.2 Carcinoma espinocelular de lábio**

O subtipo mais comum de câncer oral é o carcinoma oral de células escamosas (COCE), também chamado de carcinoma epidermóide (CEO) ou carcinoma espinocelular (CEC) (ZINI; CZERNINSKI; SGAN-COHEN, 2010). Os sítios mais prevalentes na cavidade oral variam conforme a localização geográfica, já que os fatores ambientais e culturais mudam entre as populações (ANTUNES et al., 2007). O carcinoma espinocelular de lábio (CECL) representa de 25% a 30% de todos os cânceres orais, sendo a maioria advindo da QA (uma lesão ulcerativa potencialmente maligna) (HAN et al., 2016). Os fatores de risco associados ao CECL incluem o sexo masculino, idade avançada, pele clara e exposição ao sol (REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2014). Assim, indivíduos com ocupações laborais que envolvem exposição prolongada da face ao sol, como fazendeiros e pescadores, tradicionalmente apresentam risco aumentado de câncer de lábio (MONTERO et al., 2015). Os CECLs, diferentemente dos COCEs, normalmente possuem um bom prognóstico (SCHNUR et al., 2020). No entanto, o diagnóstico em estágio inicial e o tratamento adequado contribuem para melhores desfechos.

Os sinais clínicos iniciais do CECL podem incluir crostas ou ulcerações assintomáticas que podem ser bastante equivalentes às observadas na QA. Em estágios avançados, pode ocorrer úlcera exsudativa dolorosa, coberta por crosta, com bordas endurecidas e base infiltrada que não cicatriza (VIEIRA et al., 2012; LOPES et al., 2015). Histopatologicamente o CECL é caracterizado pela proliferação de queratinócitos atípicos organizados em ilhas e cordões de tamanhos variados, que invadem o tecido conjuntivo. As células neoplásicas apresentam-se em formato poliédrico, volumosas, de limites precisos, com citoplasma amplo e claro, bem como núcleos redondos ou ovais centrais com cromatina frouxa. Individualmente elas exibem importante pleomorfismo celular e nuclear, aumento do tamanho dos núcleos e das células, nucléolos numerosos e evidentes, alteração da relação núcleo-citoplasma, maior número de figuras de mitose que são, por vezes, atípicas (MARKOPOULOS; KAYAVIS, 2004). Na maioria das vezes notam-se pérolas de queratina de tamanhos variados, evidenciando o grau de diferenciação celular. O estroma da lesão é

composto por tecido conjuntivo denso com intenso infiltrado inflamatório, destacando-se a presença de degeneração basofílica das fibras colágenas (DE FREITAS et al., 2008) (Figura 3).

**Figura 3:** Imagens histológicas de CECL. **A:** Carcinoma in situ representado por estratificação epitelial irregular, perda da polaridade das células basais, retenções em forma de gota e perda da coesão das células epiteliais. Além disso, observa-se variação anormal no tamanho e forma das células e núcleos, com hiperchromatismo e aumento da razão núcleo/citoplasma (H&E, 6X). **B:** Carcinoma superficialmente invasivo, representado por ninhos e cordões de células epiteliais malignas, iniciando a invasão para a lâmina própria com formação de pérolas de queratina e apresentando intenso infiltrado inflamatório (H&E, 4X). **C:** Carcinoma invasivo representado por ilhas de células epiteliais malignas na lâmina própria com intensa formação de pérolas de queratina e infiltrado inflamatório (H&E, 4X).



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2020).

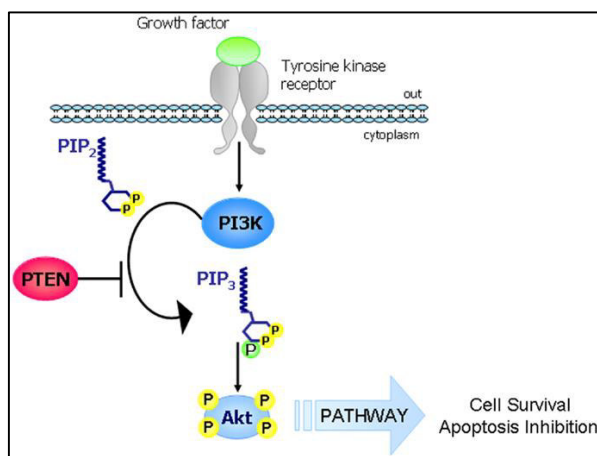
### 1.3 PTEN

O CEC é resultado de mutações genéticas e epigenéticas, que são transmitidas as gerações celulares subsequentes até que uma célula mutada torna-se independente, exibindo crescimento autossuficiente e autônomo sem responder aos sinais proliferativos inibitórios. Esse processo proliferativo desenfreado é denominado expansão clonal (TODD; DONOFF; WONG 1997). Dentre os genes capazes de inibir o crescimento celular desregrado, destaca-se o supressor tumoral PTEN também conhecido como MMAC1 (do inglês *Mutated in Multiple*

*Advanced Cancer 1*) e TEP1 (do inglês *Telomerase Protein Component 1*). PTEN é um dos principais genes supressores de tumor (SONG; SALMENA; PANDOLFI, 2012).

A cascata de sinalização celular que PTEN atua se inicia quando as células recebem estímulos extracelulares (por exemplo, presença de insulina, fatores de crescimento, quimiocinas) os quais ativam PI3K através de receptores tirosina-quinase ou receptores acoplados a proteína G, promovendo a fosforilação de PIP2 em PIP3, que fosforila e ativa AKT. PTEN antagoniza a ação de PI3K pela desfosforilação de PIP3 para gerar PIP2 e bloquear a cascata de sinalização gerada a partir de PI3K. A inativação de PTEN resulta em atividade exacerbada de PI3K na membrana plasmática e consequente recrutamento de proteínas com domínio PH (do inglês *Pleckstrin Homology Domains*) também para a membrana celular, dentre elas proteínas da família de AKT e também PDK1 (SONG; SALMENA; PANDOLFI, 2012; MOLINARI; FRATTINI, 2013). A ativação de AKT acaba gerando sobrevivência e proliferação celular, o que contribui para a tumorigênese e predispoem para o desenvolvimento do câncer (COURTNEY; CORCORAN; ENGELMAN, 2010). (Figura 4).

**Figura 4:** Esquema ilustrativo da via de sinalização celular PTEN/PI3K/AKT.



Fonte: Adaptado de Molinari; Frattini (2013).

Identificar os diversos papéis de PTEN em vários processos biológicos ajudam a melhor entender como mutações ou perda dessa proteína contribui para o fenótipo cancerígeno. Assim, diversos estudos mostram que PTEN pode atuar no metabolismo celular, motilidade celular e polaridade, regulação do microambiente tumoral, senescência e nas células-tronco cancerígenas (CSCs, do inglês *Cancer Stem Cells*) (SONG; SALMENA; PANDOLFI, 2012). Estudos sobre o metabolismo celular mostram que a ativação da via PI3K/AKT, induzida pela perda de PTEN, atua diretamente na regulação do metabolismo da glicose por meio do aumento da sua captação mediada por insulina e pela translocação membranar de GLUT4 (do inglês

*Type 4 Glucose Transporter*) (EGUEZ et al., 2005). Isso impacta diretamente no metabolismo das células malignas, uma vez que estas exibem altas taxas de produção de glicólise e lactato bem como aumento da biossíntese de lipídios e outras macromoléculas. A localização celular de PTEN na região apical da membrana plasmática da célula epitelial durante sua morfogênese é importante para a manutenção da sua polaridade (MARTIN-BELMONTE et al., 2007). Dessa forma, desregulação da via PTEN/PI3K/AKT pode levar ao processo de *epithelial-mesenchymal transition* (EMT), pois há perda das características epiteliais devido as células adquirirem propriedades mesenquimais e conseqüentemente adquirir motilidade e invasividade (SONG et al., 2009). Pesquisa com tumor de glândula mamária de camundongos mostra que o microambiente tumoral que a deleção de PTEN gera, é capaz de criar um estroma que favorece as células epiteliais malignas, uma vez que acelera a iniciação, progressão e transformação maligna celular (TRIMBOLI et al., 2009). Os níveis reduzidos de PTEN aumentam o crescimento e a proliferação celular, no entanto, se sua perda completa acontecer no início do processo de carcinogênese (fase aguda), há senescência celular, que acaba atenuando a progressão tumoral (SALMENA; CARRACEDO; PANDOLFI, 2008). Em células-tronco a perda de PTEN parece ser linhagem celular dependente, uma vez que estudos com células-tronco neurais acarreta sua expansão e vantagem proliferativa (GROSZER et al., 2008), já em células gliais a deleção de PTEN reduziu o *pool* de células (BONAGUIDI et al., 2011).

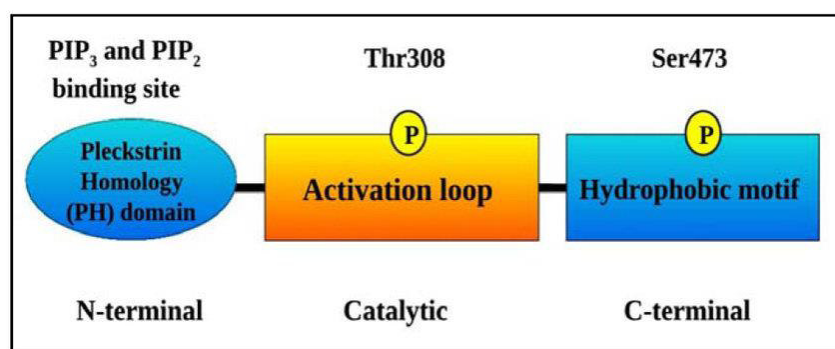
Mutações somáticas e supressão ou silenciamento epigenético que levam a perda de PTEN têm sido relatadas em uma variedade de desordens potencialmente malignas e cânceres humanos, incluindo neoplasias de mama (STANKOVIC et al., 2014; YARI; PAYANDEH; RAHIMI, 2015; SIDDIQUI et al., 2016;) nasofaringe (LI et al., 2014; PENG et al., 2016), pulmão (DRAGOJ et al., 2015; STANKOVIC et al., 2014) e esôfago (PAN et al., 2018). O papel de PTEN no câncer de lábio ainda não é completamente claro, pois somente um único estudo analisa o envolvimento de proteínas da via PTEN/PI3K/AKT no processo de carcinogênese labial (ARIOTTI et al., 2020). No entanto, somente as proteínas oncogênicas foram avaliadas.

#### **1.4 AKT**

O AKT/PKB é uma serina/treonina quinase, pertencente à família de proteínas quinase que participa de muitos processos fisiológicos, tais como o metabolismo de glicose, apoptose, proliferação, transcrição e migração, sendo registrados mais de 100 substratos diferentes que podem ser regulados pela mesma (CARNERO, 2010; TSUCHIYA; KANNO; NISHIZAKI, 2013).

O AKT apresenta três domínios: 1- o domínio de pH na região N-terminal; 2 – um domínio central catalítico e (3) o domínio regulatório localizado na região C-terminal (VADLAKONDA et al., 2013; PORTA; PAGLINO; MOSCA, 2014) (Figura 5).

**Figura 5.** Domínios organizacionais de AKT. Há a presença de um domínio N-terminal, catalítico e C-terminal (hidrofóbico). Nota-se também a presença de dois sítios de fosforilação: um resíduo treonina (localizado no domínio catalítico) e outro serina (no motivo hidrofóbico do domínio C-terminal).



Fonte: Adaptado de Basnet; Basnet, (2020).

A proteína AKT-1 está mais expressa no tecido cerebral, coração e pulmões, estando associada com hipertrofia muscular esquelética, aumento de síntese proteica, sobrevivência celular e proliferação, estando aumentada em cânceres de mama, ovário, próstata e adenocarcinomas de pulmão (OSAKI; OSHIMURA; ITO, 2004; GONZALEZ; MCGRAW, 2009); o AKT-2 é predominantemente expressa nos músculos esqueléticos e no tecido adiposo marrom onde regula a internalização da glicose via receptor GLUT4; a AKT-3 é mais expressa em cérebro e rins, mas seu papel ainda não foi totalmente elucidado (TSUCHIYA; KANNO; NISHIZAKI, 2013; FORTIER et al., 2010). A AKT-2 e AKT-3 apresentam níveis elevados em cânceres de mama e ovário e melanomas e cânceres de mama, respectivamente (FORTIER; et al., 2010).

Evidências abundantes sugerem que os componentes da via da proteína quinase B (AKT) são fatores intrínsecos para a carcinogênese (HARSHA et al., 2020). No caso de cânceres, o aumento da atividade de AKT devido a mutações somáticas resulta no comprometimento dos elementos a jusante de AKT.

Nos últimos anos, pesquisas têm tentado elucidar os mecanismos subjacentes às DEs. Desse modo, muitos biomarcadores imunoistoquímicos diferentes foram investigados na carcinogênese oral. Dentre os biomarcadores estudados, os mais investigados foram as proteínas do DNA *re-pair* seguidas de marcadores inflamatórios. Outros grupos de proteínas também foram analisados, incluindo marcadores de apoptose, metaloproteínas, marcadores do

ciclo celular, fatores de crescimento, marcadores neurais e musculares (DE SANTANA et al., 2020).

## **2 PROPOSIÇÕES**

Este trabalho teve como objetivos:

### **2.1 Objetivo Geral**

- Analisar a imunexpressão de PTEN e p-AKT em amostras de QAs e CECLs.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o perfil clínico dos pacientes acometidos por QAs e CCELS através dos dados de sexo, idade e ocupação.
- Realizar, sob microscopia de luz, em lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) de QAs, a gradação histopatológica de malignidade dos casos contendo DEs, classificando-as em leves, moderadas ou severa de acordo com a OMS (EL-NAGGAR et al., 2017).
- Realizar reclassificação das DEs gradadas de acordo com OMS (EL-NAGGAR et al., 2017) para lesões com alto/baixo risco de transformação maligna (KUJAN et al., 2006).
- Realizar, sob microscopia de luz, nas lâminas coradas em HE dos casos de CECLs, gradação histopatológica de malignidade de acordo com a OMS (EL-NAGGAR et al., 2017), classificando-as em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e indiferenciado.
- Correlacionar os dados clínicos e histopatológicos com a imunexpressão de PTEN e p-AKT.

### 3 CAPÍTULO

#### REGIMENTO INTERNO

Esta dissertação de Mestrado baseia-se no Artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado. Os resultados obtidos estão apresentados na forma de 3 artigos científicos, redigidos de acordo com as normas da revista científica escolhida para publicação.

Artigo 1: Analysis of PTEN and p-AKT immunoexpression in actinic cheilits and lip epidermoid carcinomas

Periódico: Journal of Cutaneous Pathology. (ISSN: 1600-0560)

Qualis capes: B2

Fator de Impacto: 1.587



## ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DE PTEN E p-AKT EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE LÁBIO

Carolina Maia Rodrigues<sup>1</sup>, Thâmara Manoela Marinho Bezerra<sup>2</sup>, Karuza Maria Alves Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

A queilite actínica (QA) é uma desordem potencialmente maligna que acomete com maior frequência o vermelhão do lábio inferior, caracterizada por alterações epiteliais e de tecido conjuntivo causadas pela exposição crônica à radiação solar ultravioleta (UV). A QA tem sido associada com o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de lábio (CECL), o qual representa de 12% de todos os tumores de cabeça e pescoço. A radiação UV é capaz de causar danos ao DNA, mutações em genes supressores tumorais, alterações no ciclo celular e proliferação celular desordenada, o que leva a alterações displásicas e o desenvolvimento do CECL. Pesquisas recentes, sobre o processo de carcinogênese labial, buscam identificar biomarcadores capazes de melhor entender o desenvolvimento desse processo, que possua capacidade de prever o prognóstico do CECL bem como fatores preditores da QA com maior potencial de transformação maligna. A via de sinalização celular PTEN/PI3K/AKT, uma das mais mutadas em câncer oral, pode também estar envolvida no processo de carcinogênese do câncer de lábio. Dessa forma, constitui objetivo dessa pesquisa avaliar a imunoposição de PTEN e da oncoproteína p-AKT em displasias epiteliais (DEs), oriundas de lesões de QA, e em CECLs. Foram selecionados 45 blocos parafinados, referentes a 25 biópsias incisionais de QAs e 20 biópsias incisionais de CECLs. Os resultados sociodemográficos mostram que a maioria dos pacientes com QA era do sexo masculino (n=20; 80%) e com faixa etária superior a 4ª década de vida (n = 21; 84%). A maioria dos pacientes com CECL eram do sexo masculino (n=13; 65%) e com idade superior a 40 anos (n = 20; 100%). Destes, 6 pacientes (30%) trabalhavam em ambiente com exposição solar crônica e contínua. Relativo as características histomorfológicas, grande parte das QAs apresentaram DE leve (n = 14; 56%) e 11 (55%) CECLs bem diferenciados. A imunomarcção de PTEN não revelou diferenças com significância estatística nas diferentes sublocalizações celulares analisadas entre QAs e CECLs. Também não foi observado diferenças entre as gradações histopatológicas de malignidade (GHMs) das DEs e CECLs com as sublocalizações celulares de PTEN e p-AKT. Houve maior quantidade de imunomarcção citoplasmática de PTEN do que nuclear tanto em QAs (p =

0,0008) como também em CCEs ( $p < 0,0001$ ). Outro resultado importante foi o significativo aumento de p-AKT citoplasmático, apresentando maior imunomarcção em CECLs do que em QAs ( $p = 0,0017$ ). Ainda uma maior quantidade de p-AKT citoplasmático do que nuclear foi detectado em CECLs ( $p < 0,0001$ ). Nossos achados trazem evidências do possível papel de PTEN e p-AKT no processo de carcinogênese de lábio.

**Palavras-chave:** Ceratose actínica; Carcinoma de Células Escamosas; Lesão Pré-Cancerosa; PTEN; Proteína c-akt; Imuno-Histoquímica.

## 1 INTRODUÇÃO

A queilite actínica (QA) é uma condição inflamatória crônica que tem sido descrita como uma desordem potencialmente maligna ocasionada pela exposição crônica e contínua a radiação solar ultravioleta (UV).<sup>1,2</sup> Em 95% dos casos as lesões acometem vermelhão de lábio inferior devido a maior incidência de raios solares nessa região.<sup>1,2</sup> Os indivíduos mais acometidos pela QA são aqueles que vivem em regiões tropicais e que se expõem continuamente ao sol, principalmente devido as suas atividades ocupacionais como, por exemplo, agricultores e pescadores. Aliado a isso, também é fator predisponente pessoas de pele clara (leucodermas), do sexo masculino, acima de 40 anos de idade e fumantes.<sup>2,3,4</sup> Cerca de 95% dos carcinomas espinocelulares de lábio (CECLs) podem ser precedidos por QAs.<sup>2,5</sup> Dessa forma, suas características sociodemográficas são semelhantes àquelas da QA acrescido de vulnerabilidade social, susceptibilidade genética, imunossupressão e consumo de álcool e tabaco.<sup>2,6,7.</sup>

Histopatologicamente as QAs são caracterizadas por modificações citológicas e arquiteturais, degeneração basofílica das fibras colágenas (elastose solar), displasia epitelial (DE) e até um carcinoma *in situ*.<sup>8,9</sup> A Organização Mundial da Saúde (OMS) identifica os terços epiteliais comprometidos por alterações citológicas e arquiteturais e classifica a lesão em DE leve, moderada e severa.<sup>10</sup> Atualmente, o sistema de classificação binário das DEs mostra maior consenso entre os patologistas e é mais clara para o clínico, ajudando-o a tomar melhores decisões em casos críticos.<sup>11</sup> Esse sistema de classificação tem sido utilizado em muitas pesquisas recentes.<sup>18,40</sup> No entanto, nem todas as QAs se tornam malignas, assim a classificação histopatológica das DEs é um importante preditor de malignidade. O CECL é um câncer de características clínicas menos agressivas do que o carcinoma oral de células escamosas (COCE), no entanto, possuem maior possibilidade de desenvolver metástases quando comparado com o câncer de pele, que possui o mesmo fator etiológico.<sup>12, 13</sup> Estudos adicionais que procurem melhor entender o mecanismo de carcinogênese labial, bem como a instauração desse processo são necessários.

Dentre os mecanismos que estão envolvidos no processo de carcinogênese, as falhas na supressão tumoral são mais comuns. Dentre as vias de sinalização celular mais estudadas nesse processo, destaca-se a de PTEN/PI3K/AKT. O gene supressor tumoral dessa via é o *PTEN* (do inglês *phosphatase and tensin homolog*). A expressão reduzida ou a inativação de PTEN estão envolvidos na progressão do carcinoma espinocelular.<sup>14</sup> Sua inativação ocorre através de mutações pontuais, bem como outros mecanismos genéticos e bioquímicos que acarretam na fosforilação de AKT (do inglês *Protein kinase B*) favorecendo o crescimento

celular anormal, proliferação e sobrevivência celular.<sup>15</sup> Dessa forma, monitorar quantitativamente a expressão de proteínas da via PTEN/PI3K/AKT pode contribuir para prever sobre a susceptibilidade ao câncer.<sup>16</sup>

O circuito molecular que envolve o processo de carcinogênese labial ainda é pouco entendido. Dessa forma, identificar vias que estejam envolvidas nesse processo pode ajudar na descoberta de marcadores moleculares capazes de identificar transformação maligna precoce.<sup>17</sup> A via PTEN/PI3K/AKT, uma das mais mutadas em câncer, é pouco estudada no processo de carcinogênese labial.<sup>17</sup> Diante do exposto, o presente estudo buscou compreender o processo de transformação maligna das QAs através da expressão de biomarcadores envolvidos na via PI3K/AKT por meio de imunohistoquímica. Comparações sobre a imunorreatividade desses biomarcadores com CECLs também foram realizados.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Amostra**

Um total de 25 casos de QAs e 20 casos de CECL foram obtidos dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade de Fortaleza (UNIFOR). Todas as amostras de QA apresentaram achados de DE ao exame histopatológico. Informações clínicas de sexo, idade e ocupação foram também coletadas. Este estudo foi aprovado através do comitê de ética sob número 5.122.860.

### **2.2 Análise morfológica**

Os espécimes de QAs e CECLs corados em hematoxilina e eosina (HE) foram analisados sob microscopia de luz para confirmação diagnóstica. A gradação das DEs e CECLs foi analisada conforme os critérios da OMS<sup>10</sup> (Organização Mundial da Saúde), sendo, as DEs classificadas em leve, moderada e severa e os CECLs em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e indiferenciado. Para o grupo das DEs foi aplicado em seguida o sistema binário de gradação<sup>11</sup>, o qual categoriza as DEs em baixo e alto risco de transformação maligna. Essas análises foram realizadas por um único patologista oral experiente desconhecido dos diagnósticos.

### 2.3 Análise imunoistoquímica

Os ensaios imunoistoquímicos foram realizados a partir de material embebido em parafina cortado a 5µm de espessura e disposto em lâminas histológicas silanizadas. Após desparafinização e reidratação, as lâminas foram submetidas à recuperação de epítomos induzida pelo calor (tampões de recuperação de antígeno no Quadro 1) em banho-maria (DakoCytomation). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por 30 min com 0,3% de peróxido de hidrogênio seguido de 1% de bloqueio de proteína por 10 min. Os cortes foram incubados com anticorpos primários descritos no Quadro 1. As amostras foram então incubadas com o kit de anticorpos secundários EnVision™+,HRP (Dako Co., Carpinteria, CA, USA) sendo revelado com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma Co., S. Louis, EUA). Após a revelação, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harrys. Como controle positivo foi utilizado amostra de cólon para PTEN e de adenocarcinoma de mama para p-AKT<sup>Ser473</sup>. Como controle negativo foi omitido o anticorpo primário para todas as reações.

**Quadro 1.** Especificidade, nº catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários a serem utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Origem	Diluição	Recuperação antigênica	Tempo de incubação	Fabricante
PTEN	D4.3 (9188)	Monoclonal de coelho	1:100	Tris-EDTA, pH 9.0, Banho-maria 92°C, 40 minutos	Overnight	Cell Signalling
p-AKT (Ser473)	AB 81283 (EP2109Y)	Monoclonal de coelho	1:100	Tris-EDTA, pH 9.0, Banho-maria 92°C, 40 minutos	Overnight	ABCAM

Fonte: Dados da pesquisa

Após a realização da fase laboratorial, as lâminas de cada espécime foram analisadas sob microscopia de luz (Olympus CX41, Olympus Japan Co., Tokyo, JPN). Cinco fotomicrografias foram realizadas sob o aumento de 400x com o auxílio de uma câmera (Leica DFC295 HD digital) acoplada ao microscópio óptico, sendo selecionadas as áreas displásicas nas QAs e regiões aleatórias nas amostras de CECL. As imagens obtidas foram transferidas para Las software® (Meyer Instruments, Houston, USA).

Para PTEN e p-AKT<sup>Ser473</sup> foram considerados queratinócitos imunopositivos aqueles que exibiram coloração acastanhada, independente da intensidade, em região

citoplasmática e/ou nuclear.<sup>18</sup> A análise quantitativa da expressão proteica foi realizada através da contagem dos queratinócitos imunopositivos ou não por meio do programa *Imaging Processing and Analysis in Java* (ImageJ®, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

Para a análise qualitativa, as lâminas histológicas foram examinadas no aumento de 5x a fim de que toda a extensão do espécime fosse avaliado para classificar a intensidade predominante da imunomarcação em cada sublocalização celular. Uma visão panorâmica do espécime é importante, pois tumores sólidos tendem a ser heterogêneos. Dois autores realizaram as análises em momentos separados, sem conhecimento dos dados clínicos. Qualquer discordância foi resolvida por discussão.

Os níveis de expressão de PTEN foram avaliados utilizando o escore de imunoreatividade EIR (do inglês *immunoreactive score*), o qual considera a porcentagem de células positivas (PP) e a intensidade de imunomarcação (II). O escore foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $EIR = PP \times II$ . II foi definida como 0 = ausente, 1 = fraca, 2 = moderada e 3 = intensa. Os escores atribuídos as PP foram: 0 = 1%; 1 = 1% - 10% e 2 = 11% - 50%; 3 = 51% - 80% e 4 = >80% de células positivas. A perda de PTEN foi definida como um IRS de 3 ou menos. A imunomarcação de p-AKT foi avaliada através do histoescor H, que foi calculado pela multiplicação do PP pela II correspondente (1 = fraca, 2 = moderada e 3 = intensa), resultando em um escore máximo de 300 (100% × 3). Escores H >50 foram considerados positivos. Os valores obtidos de EIR e do histoescor H foram utilizados para a análise estatística<sup>19</sup>.

## 2.1 Análise estatística

Os dados quantitativos (percentual de imunomarcação) foram expressos em forma de média e desvio padrão, tendo sido submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Por conseguinte, os dados paramétricos foram analisados por meio do teste t de Student (2 grupos) ou ANOVA (3 grupos). Ressalta-se que para o teste de ANOVA também foi analisada a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett e em casos pareados foi utilizado o teste t pareado. Já os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney (2 grupos) ou Kruskal-Wallis (3 grupos). Ressalta-se que casos de dados pareados não paramétricos foi utilizado o teste de Wilcoxon. Os dados qualitativos ordinais (escore imunorreativo) foram expressos em mediana (com valor mínimo e máximo), tendo sido submetidos aos testes não paramétricos supracitados. Já para os dados categóricos se utilizou o teste do Qui-Quadrado ou

teste exato de Fisher. É importante ainda destacar que os dados foram inicialmente tabulados no *Microsoft Excel* e posteriormente exportados para *GraphPad Prism* versão 8 e *Jamovi* versão 1.6.23, onde se realizou as análises estatísticas. Adotou-se uma confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) para todas as análises.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Perfil sociodemográfico dos pacientes com QAs e CECLs**

Dentre os 25 casos de QAs que compunham a amostra desse estudo, observou-se que sua maioria acometia pacientes do sexo masculino ( $n = 20$ ; 80%) com média de idade de 53,55 anos. Somente foi possível coletar as informações relativas às atividades laborais de 11 pacientes portadores de QAs. Assim, 8 (32%) indivíduos exerciam essas atividades com exposição solar crônica e contínua. Em relação ao CECL, a amostra foi composta de 20 casos, cuja maioria era composta por pacientes do sexo masculino ( $n = 13$ ; 65%) e com faixa etária superior a 40 anos (100%). As informações relativas ao tipo de trabalho exercido por estes pacientes estavam ausentes em 9 (45%) das fichas clínicas e 30% ( $n = 6$ ) possuíam em comum o exercício da atividade agrícola.

#### **3.2 Análise histopatológica de QAs e CECLs**

Neste estudo todas as amostras de QAs apresentaram DE no exame histopatológico. Estas foram gradadas de acordo com a OMS em leves ( $n = 14$ ; 56%), moderadas ( $n = 10$ ; 40%) e severa ( $n = 1$ ; 4%).<sup>10</sup> O sistema binário para classificação das DEs foi aplicado a fim de dicotomizar as variáveis.<sup>18</sup> Dessa forma, as amostras de QAs foram divididas em DEs de baixo risco ( $n = 14$ ; 56%) e DEs de alto risco ( $n = 11$ ; 44%). Os casos de CECL foram classificados de acordo com a OMS em bem diferenciados ( $n = 11$ ; 55%), moderadamente diferenciados ( $n = 8$ ; 40%), indiferenciados ( $n = 1$ ; 5%).<sup>10</sup>

#### **3.3 Análise da imunexpressão de PTEN nas amostras de QAs e CECLs**

A análise imunoistoquímica de PTEN revelou imunomarcção positiva em região citoplasmática, nuclear e membranas em todos os casos de QAs e CECLs. Não foi contabilizado nesse estudo a imunomarcção membranar.

Não houve diferença significativa na imunexpressão de PTEN nas diferentes sublocalizações celulares entre QAs e CECLs (tabelas 1 e 2). Porém, em QAs houve uma maior imunomarcção citoplasmática de PTEN do que imunomarcção nuclear (tabela 2).

Em relação aos sistemas de gradação para DEs (alto risco e baixo risco) e CECLs (bem diferenciado e moderadamente diferenciado) não se observou diferenças nem associações com significância estatística (Tabela 4 e 6).

Em relação ao sexo, observou-se diferenças com significância estatística nos casos de CECL, sendo que houve maior imunexpressão de PTEN citoplasmático em mulheres (Tabela 4 e 6).

### **3.4 Análise da imunexpressão de p-AKT<sup>Ser473</sup> nas amostras de QAs e CECLs**

A fosforilação de AKT em Ser473 (p-AKT<sup>Ser473</sup>) foi significativamente maior no citoplasma de CECL do que nas QAs. Esses achados foram observados tanto por análise do escore H (tabela 1), como também pelos dados de associação (dados categóricos da tabela 2).

Ressalta-se que não foi observado alterações na imunomarcção de p-AKT<sup>Ser473</sup> citoplasmático na progressão das QAs (tabelas 3 e 5) e CECLs (tabelas 4 e 6).



#### 4 DISCUSSÃO

Este trabalho evidenciou que as QAs acometiam o lábio inferior (n = 25, 100%), preferencialmente de pacientes do sexo masculino (n = 20; 80%) com média de idade de 53,55 anos. Já os casos de CECLs também costumam ter como principal sítio de acometimento o vermelhão do lábio inferior (n = 20; 100%), de homens (n = 13; 65%) com idade mais avançada quando comparado a QA (sexta e sétima décadas de vida; 75%). Esses achados corroboram com estudos que apontam que a QA e o CECL acomete principalmente a região de vermelhão de lábio inferior de indivíduos do sexo masculino e acima de 40 anos de idade.<sup>1,2,3,20,21</sup> O lábio inferior, devido a sua posição evertida, está mais propenso à radiação UV do que o lábio superior.<sup>22</sup> A predileção por indivíduos do sexo masculino ocorre porque estes exercem atividades laborais (como a agropecuária) sob exposição prolongada a radiação UV e sem o uso de aparatos.<sup>23,24</sup> A idade mais avançada de acometimento do CECL mostra que a aquisição do fenótipo maligno requer exposições crônicas e contínuas ao agente etiológico.<sup>25,26</sup> Isso é agravado pela evolução lenta da QA e pelos pacientes atribuírem seus achados clínicos ao processo de envelhecimento, o que leva a negligência da lesão e estabelecimento do CECL.<sup>23</sup> Somente foi possível coletar informações laborais de 11 casos de QAs e 11 casos de CECLs, uma vez que as fichas de biópsias não estavam completamente preenchidas. Assim, 8 (32%) dos indivíduos com QA e 6 (30%) trabalhavam com atividades que requeriam exposição solar contínua.

O sistema de gradação histopatológica (SGH) da DE continua sendo o principal método laboratorial para avaliar o risco de transformação maligna em desordens orais potencialmente malignas.<sup>27,28</sup> Dentre os sistemas de classificação das DEs, o mais utilizado é aquele recomendado pela OMS, o qual classifica as DEs em leve, moderada e severa de acordo com características citoarquiteturais.<sup>10</sup> No entanto, divergências interexaminadores revelam o caráter subjetivo dessa classificação.<sup>29</sup> Na tentativa de simplificar a categorização das DEs, Kujan et al. propuseram o sistema binário, o qual utilizava os mesmos critérios morfológicos da classificação da OMS.<sup>11</sup> Esse sistema classificava as DEs em baixo e alto risco de transformação maligna. A amostra de QAs desta pesquisa consistiu principalmente de casos de baixo risco de transformação maligna (n = 14; 56%). Outros estudos mostram resultados semelhantes, havendo maior incidência

de QAs exibindo DEs de baixo risco ou DE leve no momento da biópsia.<sup>7,30</sup> Segundo De Santana et al. esses achados podem somente refletir as variações no tempo de diagnóstico das lesões.<sup>23</sup> É importante salientar que determinar o grau de displasia das desordens potencialmente malignas é imprescindível para a adoção da conduta terapêutica adequada, pois os SGHs são ferramentas essenciais na predição do prognóstico dessas lesões.<sup>7,25,31</sup>

Em relação aos casos de CECLs desse estudo, é importante destacar que eles foram gradados de acordo com a OMS, sendo que metade (n = 10; 50%) da amostra foi composta por CECL bem diferenciados.<sup>10</sup> Estudo com resultado semelhante mostra que CECLs bem diferenciados compõem a maioria dos casos de CECLs, o que pode haver associação com um prognóstico mais favorável.<sup>32</sup> É importante ressaltar que CECLs são patologias distintas de outras formas de câncer intraoral, pois apresentam fisiopatologia e comportamentos únicos, compartilhando de características tanto de mucosa oral quanto de pele.<sup>21,33</sup> Os mecanismos moleculares das QAs e CECLs ainda são desconhecidos.<sup>24</sup> Dessa forma, este estudo, se propôs a investigar o papel da via PTEN/PI3K/AKT, através do supressor tumoral PTEN e a oncoproteína p-AKT<sup>Ser473</sup>, na carcinogênese do câncer de lábio. A função citoplasmática de PTEN é bem estabelecida e está relacionada principalmente com a regulação negativa da via oncogênica PI3K/AKT.<sup>25</sup> Já PTEN nuclear atua de forma independente de AKT,<sup>26,27,28</sup> exercendo principalmente atividades que regulam o crescimento celular e a estabilidade genômica.<sup>29,26</sup> Com base nesses achados, como a sublocalização intracelular de PTEN afeta seu papel, nós analisamos, através de imunistoquímica, as diversas localizações intracelulares de PTEN. Foi observado que, independentemente da sublocalização celular, PTEN apresentou imunomarcção semelhante entre QAs e CECLs (Tabela 1), havendo imunexpressão bastante reduzida de PTEN em ambas as lesões (Figura 1). Apesar de possuir fatores etiológicos distintos, DEOs (displasias epiteliais orais) e COCEs são lesões com o mesmo subtipo histopatológico das QAs e CECLs. Com base nisso, achados semelhantes são descritos por estudos que detectaram que DEOs apresentam baixa regulação de PTEN.<sup>39,40</sup> Isso sugere que a perda dessa proteína é um fenômeno que acontece logo no início do processo de malignização, similar ao que tem sido descrito para DEOs e CEOs,<sup>39,40</sup> fibrose oral submucosa<sup>41</sup> bem como no câncer de endométrio<sup>42</sup>. No entanto, estudos mostram que há diminuição progressiva da expressão de PTEN conforme o processo de malignização avança de uma lesão potencialmente maligna para uma

neoplasia, o que é distinto de nossos achados, que apontam expressão de PTEN constante e reduzida tanto nas QAs quanto nos CECLs (Tabela 1).<sup>39,41</sup> Apesar dos níveis reduzidos de PTEN acarretarem maior crescimento e proliferação celular, sua perda completa, no início do processo de carcinogênese (fase aguda), leva a senescência celular, o que atenua a progressão tumoral.<sup>43</sup> Como o câncer de lábio possui curso clínico de baixa agressividade, prognóstico favorável e progride lentamente, possivelmente a menor imunoposição de PTEN no estágio de QA contribui para o melhor prognóstico do CECL.<sup>44</sup>

A perda da expressão de PTEN no câncer é um achado comum. Cerca de 30% dos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECPs) possuem ausência ou regulação negativa de PTEN.<sup>39</sup> A falta de expressão de PTEN possui significado prognóstico, pois frequentemente resulta em tumores mais agressivos, ou seja, que repercutem em achados clínicos de pobre sobrevida global bem como livre da doença.<sup>45</sup> Neste trabalho, a associação entre imunoposição de PTEN (nas suas diferentes sublocalizações celulares) e os correspondentes graus de malignidade oriundos da classificação do sistema GHM para DEs e CECLs (Tabelas 4 e 6) não obteve significância estatística. Assim, independente do risco de transformação maligna da DE e do grau de malignidade do CECL, a expressão de PTEN permaneceu a mesma (Figura 1). Estudo aponta que alguns casos de CCECP bem diferenciados apresentam maior imunoposição de PTEN, porém em seus fronts invasivos havia expressão reduzida dessa proteína.<sup>39</sup> De forma semelhante, DEOs apresentavam expressão reduzida de PTEN preferencialmente em região epitelial de contato com o tecido conjuntivo (camada basal e parabasal).<sup>39</sup> Esses achados indicam que PTEN pode ser regulado através da relação das células cancerígenas com o microambiente tumoral.<sup>39</sup> Além desses aspectos é importante destacar que é nas áreas displásicas que ocorre a perda do gene supressor tumoral PTEN e que é esperado haver menor imunoposição de sua respectiva proteína nessa região. Além disso, devido nossos casos de CECLs serem advindos de biópsias incisionais, não foi possível localizar a área de frente do tumor, o que torna isso uma limitação do nosso estudo. A fim de minimizar esse aspecto, nós realizamos as fotomicrografias dos casos de CECLs em regiões aleatórias. No entanto, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre as diferentes categorizações do sistema GHM aplicadas ao CECLs, é possível observar clara diferença entre CECLs bem diferenciados e moderadamente diferenciados (Figura 1).

Quanto ao sexo, a maior ocorrência de câncer em indivíduos pode estar associada ao maior contato com os fatores de risco mais importantes, como o grande consumo de álcool e tabaco para o câncer intraoral e radiação ultravioleta para o câncer de lábio, naqueles que exercem suas atividades laborais ao sol.<sup>46</sup> As mulheres costumam ser menos acometidas pelo CECL pelo maior uso de roupas e batom, os quais atuam como fatores de proteção.<sup>23,47</sup> Os homens são mais propícios ao desenvolvimento do CECL pois costumam se expor ao sol mais prolongadamente e sem uso de agentes que protegem do sol, além de se aposentarem mais tardiamente, em comparação as mulheres.<sup>27</sup> Isso embasa nossos achados sobre uma maior quantidade de PTEN citoplasmático em mulheres (Tabela 4) e sua perda em homens (Tabela 6). Porém, de acordo com Pires et al.<sup>47</sup> as mudanças nas atividades sociais e de estilo de vida da mulher na atualidade estão tornando-as mais expostas a agentes carcinogênicos, o que tem aumentado a frequência de câncer nessas pacientes.

Nosso grupo tem estudado previamente a via PI3K/AKT na carcinogênese oral do CEO, observando maior imunoexpressão de p-AKT (em diferentes sublocalizações celulares) em CEOs quando comparado a DEOs e ao tecido normal.<sup>18</sup> A ativação de AKT se inicia na membrana plasmática com sua fosforilação em duas porções: Thr308 (através de PDK1 - *phosphoinositide-dependent kinase 1*) e Ser473 (por MTORC2 - *mammalian target of rapamycin*). Quando p-AKT é translocado para o citoplasma, há execução de suas diversas funções oncogênicas (metabolismo da glicose, apoptose, proliferação e crescimento celular, devido sua ação em diferentes substratos.<sup>49</sup> Ainda não se sabe exatamente como p-AKT é translocado para o núcleo, no entanto uma vez lá, há progressão do ciclo celular e supressão da apoptose.<sup>50,51</sup> Nós encontramos que a ativação de AKT, resultado de sua fosforilação em Ser473 (p-AKT<sup>Ser473</sup>), ocorreu mais em CECLs do que nas QAs ( $p < 0,0001$ ; (Tabela 1) (Figura 1), dessa forma, foi significativamente maior a positividade citoplasmática de p-AKT<sup>Ser473</sup> em CECLs ( $p = 0,0005$ ; Tabela 2). Isso significa que o acúmulo de p-AKT citoplasmático é um evento necessário para a processo de carcinogênese labial, uma vez que está associado com a aquisição do fenótipo maligno. Esse resultado é semelhante a estudos conduzidos com leucoplasias (também classificada como uma desordem potencialmente maligna) e CEOs, porém difere do estudo de Ariotti et al. com amostras de QAs e CECLs, o qual detectou quantidades semelhantes de p-AKT<sup>Ser473</sup> nas duas lesões.<sup>17,48,52,53,54</sup> A distinção dos resultados entre os estudos pode ter ocorrido devido ao uso de metodologia

semiquantitativa para aferir a porcentagem de células imunomarcadas para p-AKT<sup>Ser473</sup> por Ariotti et al.<sup>17</sup> ou porque esses autores não analisaram as diferentes sublocalizações celulares de p-AKT<sup>Ser473</sup>. Estudar as a compartimentalização celular de p-AKT<sup>Ser473</sup> é importante uma vez que os substratos alvejados por esta proteína são diferentes nos respectivos compartimentos celulares. Em estudo prévio, nosso grupo observou que há maior imunomarcação nuclear de p-AKT<sup>Ser473</sup> bem como significativa quantidade de células com imunomarcação citoplasmática fraca em CEOs do que em DEOs e tecido normal.<sup>18</sup> Esses achados sugerem que no câncer oral há translocação nuclear de p-AKT, o que diminuiria sua biodisponibilidade em outras sublocalizações celulares.<sup>18</sup> No entanto, na carcinogênese de lábio, o mecanismo de ação de p-AKT<sup>Ser473</sup> parece ser distinto, uma vez que não há indícios de seu acúmulo nuclear no processo de malignização, somente citoplasmático (Tabela 1). No entanto, não há alterações na imunomarcação de p-AKT<sup>Ser473</sup> citoplasmático na progressão das QAs (Tabelas 3 e 5) e CECLs (Tabelas 4 e 6). Isso sugere que o acúmulo citoplasmático de p-AKT<sup>Ser473</sup> é um evento que ocorre não somente no processo de carcinogênese labial como também no seu estabelecimento uma vez que não há alterações na sua expressão na progressão das QAs e CECLs.

Os dados clínicos obtidos dos pacientes com QAs e CECLs reforçam o perfil do indivíduo portador de QA e CECL, já bem estabelecidos na literatura. Sexo, idade e profissão não influenciaram nas gradações histopatológicas de ambas os grupos. Observamos que a perda de PTEN é um evento precoce no processo de carcinogênese do câncer de lábio. Além disso, o acúmulo de p-AKT<sup>Ser473</sup> citoplasmático também ocorre nesse processo, embora sua quantidade não varie com a progressão histopatológica das QAs e CECLs. Portanto, nossos achados trazem evidências do papel de PTEN e p-AKT no processo de carcinogênese labial.

## REFERÊNCIAS

1. Lucena EE, Costa DC, da Silveira EJ, Lima KC. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. *Oral Dis*. 2012 Sep;(6):575-9.
2. Silva LVO, de Arruda JAA, Abreu LG, Ferreira RC, da Silva LP, Pelissari C, Silva RNF, Nóbrega KHS, de Andrade BAB, Romañach MJ, Agostini M, Nonaka CFW, Alves PM, Pontes HAR, Rivero LF, de Souza LB, Trierveiler M, Mendonça EF, Gomes APN, Martins MD, Andrade ESS, da Silveira MMF, Sobral APV, Mesquita RA. Demographic and Clinicopathologic Features of Actinic Cheilitis and Lip Squamous Cell Carcinoma: a Brazilian Multicentre Study. *Head Neck Pathol*. 2020;14(4):899-908.
3. Piñera-Marques K, Lorenço SV, Silva LF, Sotto MN, Carneiro PC. Actinic lesions in fishermen's lower lip: clinical, cytopathological and histopathologic analysis. *Clinics*. 2010;65(4):363-7.
4. Jadotte YT, Schwartz RA. Solar cheilosis: an ominous precursor: part I. Diagnostic insights. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(2):173-84.
5. Gomes JO, de Vasconcelos Carvalho M, Fonseca FP, Gondak RO, Lopes MA, Vargas PA. CD1a+ and CD83+ Langerhans cells are reduced in lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(6):433-9.
6. Perea-Milla López E, Miñarro-Del Moral RM, Martínez-García C, Zanetti R, Rosso S, Serrano S, Aneiros JF, Jimenez-Puente A, Redondo M. Lifestyles, environmental and phenotypic factors associated with lip cancer: a case-control study in southern Spain. *Br J Cancer*. 2003;88(11):1702-7.
7. Lopes ML, Silva Júnior FL, Lima KC, Oliveira PT, Silveira ÉJ. Clinicopathological profile and management of 161 cases of actinic cheilitis. *An Bras Dermatol*. 2015;90(4):505-12.
8. Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(3): 498-503.
9. Jadotte YT, Schwartz RA. Solar cheilosis: an ominous precursor part II. Therapeutic perspectives. *J Am Acad Dermatol*. 2012;66(2):187-98;
10. El-Naggar, A.K. et al. World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. Lyon: IARC, 2017.
11. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol*. 2006;42(10): 987-993.
12. Abreu MA, Silva OM, Neto Pimentel DR, Hirata CH, Weckx LL, Alchorne MM, Michalany NS. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006;72(6):767-71.
13. Dancyger A, Heard V, Huang B, Suley C, Tang D, Ariyawardana A. Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. *J Investig Clin Dent*. 2018;9(4):e12343.
14. Giudice FS, Squarize CH. The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. *J Carcinog Mutagen*. 2013;Suppl 5:003.

15. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008;27(41):5497-510.
16. Carracedo A, Alimonti A, Pandolfi PP. PTEN level in tumor suppression: how much is too little? *Cancer Res*. 2011;71(3):629-33.
17. Ariotti C, Gabriel AF, Ribeiro JT, Martins MAT, Vargas PA, Pilar EFS, Castilho RM, Carrard VC, Wagner VP, Martins MD. PI3K/AKT/mTOR pathway activation in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinomas. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34(9):e505-e506.
18. Chaves FN, Bezerra T, de Barros Silva PG, Oliveira F, Sousa FB, Costa F, Alves A, Pereira K. Evaluation of the p-AKT, p-JNK and FoxO3a function in oral epithelial dysplasia. *Oral Dis*. 2017;23(3):367-378.
19. Esteva FJ, Guo H, Zhang S, Santa-Maria C, Stone S, Lanchbury JS, Sahin AA, Hortobagyi GN, Yu D. PTEN, PIK3CA, p-AKT, and p-p70S6K status: association with trastuzumab response and survival in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Am J Pathol*. 2010;177(4):1647-56.
20. Bozan N, Kocak OF, Cankaya H, Kiroglu Mehmet Hafit Gur AF, Erten R. Lip cancer: A 16-year retrospective epidemiological study in Eastern part of Turkey. *J Pak Med Assoc*. 2016;66(11):1433-1435.
21. Domínguez-Gordillo A, Esparza-Gómez G, García-Jiménez B, Cerero-Lapiedra R, Casado-Gómez I, Romero-Lastra P, Warnakulasuriya S. The pattern of lip cancer occurrence over the 1990-2011 period in public hospitals in Madrid, Spain. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(3):202-10.
22. Scheinberg RS. Carbon dioxide laser treatment of actinic cheilitis. *West J Med*. 1992;156(2):192-3.
23. De Santana Sarmiento DJ, da Costa Miguel MC, Queiroz LM, Godoy GP, da Silveira EJ. Actinic cheilitis: clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. *Int J Dermatol*. 2014;53(4):466-72.
24. Correa GT, Bernardes VF, de Sousa SF, Diniz MG, Salles JM, Souza RP, De-Paula AM, Gomez RS, Gomes CC. Lip cancer and pre-cancerous lesions harbor TP53 mutations, exhibit allelic loss at 9p, 9q, and 17p, but no BRAFV600E mutations. *Tumour Biol*. 2015;36(11):9059-66.
25. Mello FW, Melo G, Modolo F, Rivero ER. Actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: Literature review and new data from Brazil. *J Clin Exp Dent*. 2019;11(1):62-69.
26. Rodríguez-Blanco I, Flórez Á, Paredes-Suárez C, Rodríguez-Lojo R, González-Vilas D, Ramírez-Santos A, Paradela S, Suárez Conde I, Pereiro-Ferreirós M. Actinic Cheilitis Prevalence and Risk Factors: A Cross-sectional, Multicentre Study in a Population Aged 45 Years and Over in North-west Spain. *Acta Derm Venereol*. 2018;98(10):970-974.
27. Warnakulasuriya, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, [s. l.], v. 45, n. 4–5, p. 309–316, 2009.

28. Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. *Oral Dis.* 2021;27(8):1947-1976.
29. Shubhasini AR, Praveen BN, Hegde U, Uma K, Shubha G, Keerthi G, Shiladitya S. Inter- and Intra-Observer Variability in Diagnosis of Oral Dysplasia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(12):3251-3254.
30. Câmara PR, Dutra SN, Takahama Júnior A, Fontes K, Azevedo RS. A comparative study using WHO and binary oral epithelial dysplasia grading systems in actinic cheilitis. *Oral Dis.* 2016;22(6):523-9.
31. Pilati S, Bianco BC, Vieira D, Modolo F. Histopathologic features in actinic cheilitis by the comparison of grading dysplasia systems. *Oral Dis.* 2017;23(2):219-224
32. Strieder L, Coutinho-Camillo CM, Costa V, da Cruz Perez DE, Kowalski LP, Kaminagakura E. Comparative analysis of three histologic grading methods for squamous cell carcinoma of the lip. *Oral Dis.* 2017;23(1):120-125.
33. Kornevs E, Skagers A, Tars J, Bigestans A, Lauskis G, Libermanis O. 5 year experience with lower lip cancer. *Stomatologija.* 2005;7(3):95-8.
34. Misra S, Ghosh G, Chowdhury SG, Karmakar P. Non-canonical function of nuclear PTEN and its implication on tumorigenesis. *DNA Repair (Amst).* 2021;107:103197.
35. Liu JL, Sheng X, Hortobagyi ZK, Mao Z, Gallick GE, Yung WK. Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation. *Mol Cell Biol.* 2005;25(14):6211-24.
36. 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.
37. Wang X, Huang H, Young KH. The PTEN tumor suppressor gene and its role in lymphoma pathogenesis. *Aging.* 2015;7(12):1032-49.
38. 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.
39. Squarize CH, Castilho RM, Abrahao AC, Molinolo A, Lingen MW, Gutkind JS. PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. *Neoplasia.* 2013;15(5):461-71.
40. Chaves FN, Bezerra TMM, Moraes DC, Costa SFDS, Silva PGB, Alves APNN, Costa FWG, Bernardes VF, Pereira KMA. Loss of heterozygosity and immunoexpression of PTEN in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2019;112:104341.
41. Angadi PV, Krishnapillai R. Evaluation of PTEN immunoexpression in oral submucous fibrosis: role in pathogenesis and malignant transformation. *Head Neck Pathol.* 2012;6(3):314-21.
42. Watkins JC, Downing MJ, Crous-Bou M, Busch EL, Chen M, De Vivo I, Mutter GL. Endometrial Tumor Classification by Histomorphology and Biomarkers in the Nurses' Health Study. *J Cancer Epidemiol.* 2021;2021:8884364.



43. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell*. 2008 May;133(3):403-14.
44. Vieira RA, Minicucci EM, Marques ME, Marques SA. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. *An Bras Dermatol*. 2012;87(1):105-14.
45. Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*. 2000;100(4):387-90.
46. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol 2000*. 2011;57(1):19-37.
47. Pires FR, Ramos AB, Oliveira JB, Tavares AS, Luz PS, Santos TC. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci*. 2013;21(5):460-7.
48. Martins-Filho PR, Da Silva LC, Piva MR. The prevalence of actinic cheilitis in farmers in a semi-arid northeastern region of Brazil. *Int J Dermatol*. 2011;50(9):1109-14.
49. Mukherjee A, Misra S, Howlett NG, Karmakar P. Multinucleation regulated by the Akt/PTEN signaling pathway is a survival strategy for HepG2 cells. *Mutat Res*. 2013;755(2):135-40.
50. Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, Evangelisti C. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(12):2168-78.
51. Noguchi M, Hirata N, Suizu F. The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1846(2):342-52.
52. Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, Benavides F, Conti CJ, Sauk J, Sausville EA, Molinolo AA, Gutkind JS. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res*. 2004;10(12 Pt 1):4029-37.
53. Pontes HA, de Aquino Xavier FC, da Silva TS, Fonseca FP, Paiva HB, Pontes FS, dos Santos Pinto D Jr. Metallothionein and p-Akt proteins in oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(8):644-50.
54. Pontes HA, Pontes FS, de Jesus AS, Soares MC, Gonçalves FL, de Lucena Botelho T, do Carmo Ribeiro J, Dos Santos Pinto D Jr. p-Akt and its relationship with clinicopathological features and survival in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 2015;44(7):532-7.

**Tabela 1** – Perfil de imunoposição para PTEN e p-AKT<sup>Ser473</sup> em diferentes sublocalizações celulares de QAs e CECLs.

Lesão	PTEN		p-Valor	p-AKT <sup>Ser473</sup>		p-Valor
	EIR (núcleo)	EIR (citoplasma)		H (núcleo)	H (citoplasma)	
QA	0 (0-3)	2 (0-4)	<b>0,0008<sup>*b</sup></b>	59 (0-186)	62 (0-200)	0,8199 <sup>a</sup>
CECL	0 (0-3)	2 (2-6)	<b>&lt; 0,0001<sup>*b</sup></b>	42 (0-99)	139 (61-294)	<b>&lt;0,0001<sup>*b</sup></b>
<b>p-Valor</b>	0,3528 <sup>a</sup>	0,7341 <sup>a</sup>		0,4067 <sup>a</sup>	<b>&lt; 0,0001<sup>*a</sup></b>	

Legenda: EIR: Escore de imunorreatividade; H: escore H; QA: queilite actínica; CECL: carcinoma espinocelular de lábio; <sup>a</sup> Teste de Mann-Whitney; <sup>b</sup> Teste T pareado. Os dados estão expressos em mediana (mínimo e máximo). \*p < 0,005

**Tabela 2** – Associação entre perda e ganho de PTEN / positividade e negatividade de p-AKT<sup>Ser473</sup> em QAs e CECLs nas diferentes sublocalizações celulares.

Imunomarcador	Sublocalização celular	Categorização de EIR/H	Lesão	
			QA	CECL
PTEN	Núcleo	Ganho	0	0
		Perda	25	20
		p-Valor	>0,9999 <sup>a</sup>	
p-AKT <sup>Ser473</sup>	Citoplasma	Ganho	2	3
		Perda	23	17
		p-Valor	0,6423 <sup>a</sup>	
p-AKT <sup>Ser473</sup>	Núcleo	Positivo	16	8
		Negativo	9	12
		p-Valor	0,1926 <sup>b</sup>	
	Citoplasma	Positivo	14	20
		Negativo	11	0
			<b>0,0005<sup>*a</sup></b>	

Legenda: EIR: Escore de imunorreatividade; H: escore H; QA: queilite actínica; CECL: carcinoma espinocelular de lábio; <sup>a</sup> Teste Exato de Fisher; <sup>b</sup> Teste do Qui-Quadrado. Os dados estão expressos em frequência absoluta.

\*p < 0,005

**Tabela 3** - Influência de características clinicopatológicas de QAs na imunoposição de PTEN e p-AKT<sup>Ser473</sup>.

	PTEN		p-AKT <sup>Ser473</sup>	
	EIR (núcleo)	EIR (citoplasma)	H (núcleo)	H (citoplasma)
<b>GHM</b>				
Baixo risco	0 (0-3)	2,5 (0-4)	62 (0-186)	52 (0-200)
Alto risco	0 (0-3)	2 (0-4)	56 (0-185)	62 (0-99)

<b>p-Valor</b>	0,837 <sup>a</sup>	0,130 <sup>a</sup>	1,000 <sup>a</sup>	0,670 <sup>a</sup>
<b>Idade</b>				
<40	0 (0-3)	2 (0-2)	64 (64-185)	65 (57-66)
40-60	0 (0-3)	2 (0-4)	28 (0-186)	35 (0-200)
>60	0 (0-3)	2 (0-4)	56 (0-83)	79 (0-99)
<b>p-Valor</b>	0,975 <sup>b</sup>	0,522 <sup>b</sup>	0,286 <sup>b</sup>	0,143 <sup>b</sup>
<b>Sexo</b>				
Masculino	0 (0-3)	2 (0-4)	64 (0-186)	59,5 (0-200)
Feminino	0 (0-3)	2 (0-4)	54 (0-56)	62 (0-99)
<b>p-Valor</b>	0,711 <sup>a</sup>	0,775 <sup>a</sup>	0,107 <sup>a</sup>	0,633 <sup>a</sup>

Legenda: EIR: Escore de imunorreatividade; H: escore H; GHM: Gradação histopatológica de malignidade; <sup>a</sup> Teste de Mann-Whitney, <sup>b</sup> Teste de Kruskal-Wallis; Os dados estão expressos em mediana (mínimo e máximo).

**Tabela 4** - Comparação da imunomarcção de PTEN e p-AKT em CECLs de acordo com as características sociodemográficas e clínicas.

	PTEN		p-AKT <sup>Ser473</sup>	
	EIR (núcleo)	EIR (citoplasma)	H (núcleo)	H (citoplasma)
<b>GHM</b>				
Bem diferenciado	0 (0-3)	3 (0-6)	60 (0-99)	129 (61-293)
Moderadamente diferenciado	0 (0-2)	2 (0-3)	41 (0-77)	141 (73-294)
<b>p-Valor</b>	0,383 <sup>a</sup>	0,208 <sup>a</sup>	0,284 <sup>a</sup>	0,710 <sup>a</sup>
<b>Idade</b>				
<40	-	-	-	-
40-60	0 (0-2)	2 (0-3)	44 (0-77)	160 (85-294)
>60	0 (0-3)	2 (0-6)	38 (0-99)	129 (61-293)
<b>p-Valor</b>	1,000 <sup>a</sup>	0,442 <sup>a</sup>	0,930 <sup>a</sup>	0,230 <sup>a</sup>
<b>Sexo</b>				
Masculino	0 (0-3)	2 (0-3)	41 (0-99)	129 (61-293)
Feminino	0 (0-2)	3 (2-6)	52,5 (0-91)	192 (73-294)
<b>p-Valor</b>	0,649 <sup>a</sup>	<b>0,017<sup>a</sup></b>	0,749 <sup>a</sup>	0,157 <sup>a</sup>

Legenda: EIR: Escore de imunorreatividade; H: escore H; GHM: Gradação histopatológica de malignidade; <sup>a</sup> Teste de Mann Whitney. Os dados estão expressos em frequência absoluta.

**Tabela 5** - Associação entre perda e ganho de PTEN / positividade e negatividade de p-AKT<sup>Ser473</sup> em QAs nas diferentes sublocalizações celulares

Imunomarcador	Sublocalização celular	Categorização de EIR/H	GHM		Idade			Sexo	
			Baixo risco	Alto risco	<40	40-60	>60	Masculino	Feminino
PTEN	Núcleo	Ganho	0	0	0	0	0	0	0
		Perda	16	9	3	12	9	20	5
	Citoplasma	p-Valor	>0,9999 <sup>a</sup>		1,000 <sup>a</sup>			>0,9999 <sup>a</sup>	
		Ganho	1	1	0	1	1	1	1
		Perda	15	8	3	11	8	19	4
		p-Valor	1,000 <sup>a</sup>		1,000 <sup>a</sup>			0,367 <sup>a</sup>	
p-AKT <sup>Ser473</sup>	Núcleo	Positivo	10	6	3	6	6	13	3
		Negativo	6	3	0	6	3	7	2
	Citoplasma	p-Valor	1,000 <sup>a</sup>		0,264 <sup>a</sup>			1,000 <sup>a</sup>	
		Positivo	8	6	3	4	7	11	3
		Negativo	8	3	0	8	2	9	2
		p-Valor	0,677 <sup>a</sup>		<b>0,045<sup>*a</sup></b>			1,000 <sup>a</sup>	

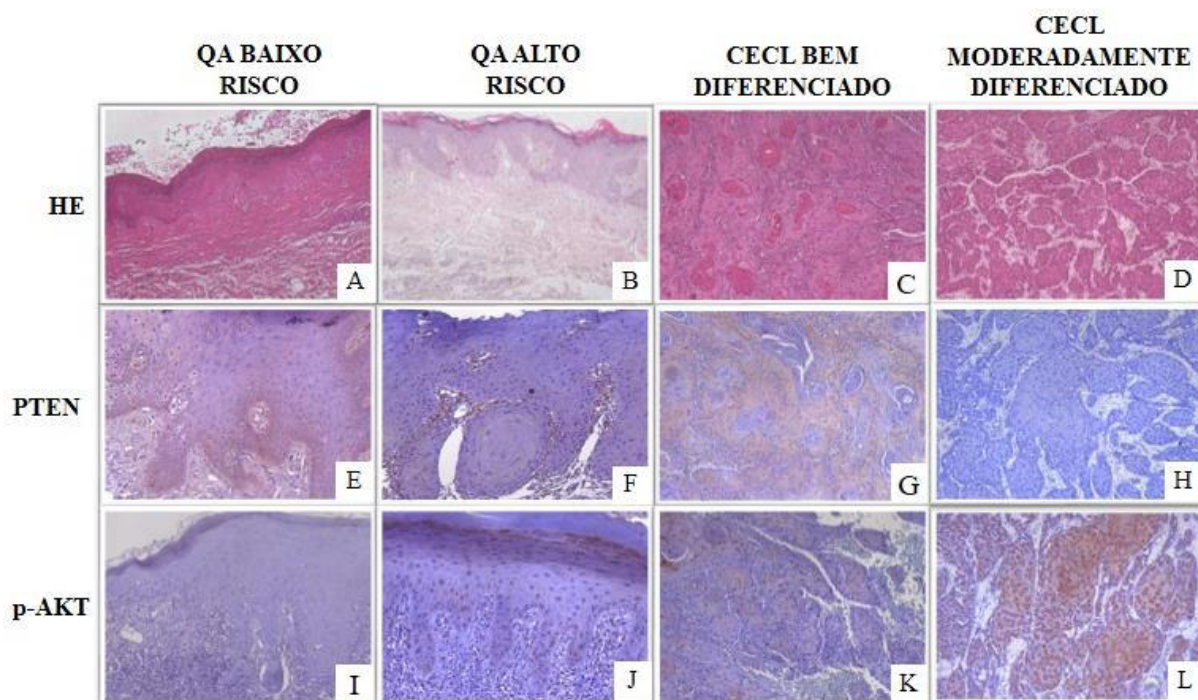
Legenda: EIR: Escore de imunorreatividade; H: escore H; GHM: Gradação histopatológica de malignidade; <sup>a</sup> Teste exato de Fisher. Os dados estão expressos em frequência absoluta. \*p<0.005.

**Tabela 6** - Associação entre perda e ganho de PTEN / positividade e negatividade de p-AKT<sup>Ser473</sup> em CECLs nas diferentes sublocalizações celulares

Imunomarcador	Sublocalização celular	Categorização de EIR/H	GHM		Idade			Sexo	
			Bem diferenciado	Moderadamente diferenciado	<40	40-60	>60	Masculino	Feminino
PTEN	Núcleo	Ganho	0	0	-	0	0	0	0
		Perda	11	9	-	5	15	13	7
		p-Valor		>0,9999 <sup>a</sup>		>0,9999 <sup>a</sup>		>0,9999 <sup>a</sup>	
	Citoplasma	Ganho	3	0	-	0	3	0	3
		Perda	8	9	-	5	12	13	4
		p-Valor		0,218 <sup>a</sup>		0,539 <sup>a</sup>		<b>0,031<sup>a</sup></b>	
p-AKT <sup>Ser473</sup>	Núcleo	Positivo	6	2	-	1	7	4	4
		Negativo	5	7	-	4	8	9	3
		p-Valor		0,197 <sup>a</sup>		0,603		0,356	
	Citoplasma	Positivo	11	9	-	5	15	13	7
		Negativo	0	0	-	0	0	0	0
		p-Valor		>0,9999 <sup>a</sup>		>0,9999 <sup>a</sup>		>0,9999 <sup>a</sup>	

Legenda: EIR: Escore de imunorreatividade; H: escore H; CECL: carcinoma espinocelular de lábio; <sup>a</sup> Teste exato de Fisher. Os dados estão expressos em frequência absoluta.  
\*p<0.005.

**Figura 1** Perfil Histoquímico e Imunoistoquímico de QAs e CECLs. A; B: Coloração em H&E de QAs de baixo e alto risco de transformação maligna, respectivamente. C; D: Coloração em H&E de CECLs bem diferenciados e moderadamente diferenciados, respectivamente. E; F: Imunoexpressão de PTEN em QAs predominantemente citoplasmática (200x). G; H: Imunoexpressão de PTEN em CECLs predominantemente citoplasmática em casos bem diferenciados (200x). I; J: Imunoexpressão de p-AKTSer473 em QAs. K; L: Imunoexpressão de p-AKTSer473 em CECLs (200x). Observa-se uma maior imunomarcagem em citoplasma nos casos moderadamente diferenciados.



#### **4 CONCLUSÕES GERAIS**

Os dados clínicos obtidos dos pacientes com QAs e CECLs reforçam o perfil do indivíduo portador de QA e CECL, já bem estabelecidos na literatura. Sexo, idade e profissão não influenciaram nas gradações histopatológicas de ambas os grupos. Observamos que a perda de PTEN é um evento precoce no processo de carcinogênese do câncer de lábio. Além disso, o acúmulo de p-AKT Ser473 citoplasmático também ocorre nesse processo, embora sua quantidade não varie com a progressão histopatológica das QAs e CECLs. Portanto, nossos achados trazem evidências do papel de PTEN e p-AKT no processo de carcinogênese labial.

## REFERÊNCIAS

- ANTUNES, J. L. F; TOPORCOV, T. N; WÜNSCH-FILHO, V. Resolutividade da campanha de prevenção e diagnóstico precoce do câncer bucal em São Paulo, Brasil. **Rev Panam Salud Publica**. v. 21, n. 1, p. 30–6, 2007.
- ARIOTTI, A.F. et al. PI3K/AKT/mTOR pathway activation in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinomas. **Eur Acad Dermatol Venereol**. V. 34, p e433–e531, 2020.
- ARNAUD, R. R et al. Actinic cheilitis: histopathological evaluation of 44 cases. **Rev Odontol UNESP**. v. 43 n. 6 p. 384-389, 2014.
- BAKIRTZI. K. et al. Treatment Options and Post-Treatment Malignant Transformation Rate of Actinic Cheilitis: A Systematic Review. **Cancers (Basel)**. v. 4, n.13, p. 3354, 2021.
- BARNES, L; EVESON, J. W; REICHART, P; SIDRANSKY, D. World Health Organization Classification of Tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
- BONAGUIDI M.A. et al. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. **Cell**. v.145, n. 7, p. 1142-55, 2011.
- BOTA, J. P; LYONS, A. B; CARROLL, B. T. Squamous Cell Carcinoma of the Lip-A Review of Squamous Cell Carcinogenesis of the Mucosal and Cutaneous Junction. **Dermatol Surg**. v.43, n.4, p. 494-506, 2017.
- CÂMARA, 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, 2016.
- CARNERO, A. The PKB/AKT pathway in cancer. **Curr Pharm Des**. v. 16, n. 1, p. 34-44, 2010.
- CARVALHO M. V. et al. Surgical versus non-surgical treatment of actinic cheilitis: A systematic review and meta-analysis. **Dis. Oral**. v. 25, p. 972-981, 2019.
- CASTIÑEIRAS, I. et al. Actinic cheilitis: evolution to squamous cell carcinoma after carbon dioxide laser vaporization. A study of 43 cases. **J Dermatolog Treat**. v. 21, n. 1, p. 49-53, 2010.
- CHAVES, F. N. et al. Evaluation of the p-AKT, p-JNK and FoxO3a function in oral epithelial dysplasia. **Oral Dis**., v. 23, p. 367-378, 2017.
- CHAVES, F. N. et al. Loss of heterozygosity and immunoexpression of PTEN in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **Exper Mol Pathol**, v. 112, p. 104341, 2019.
- CHOQUET, H. et al., Genetic and environmental factors underlying keratinocyte carcinoma risk. **JCI Insight**. v. 5, n. 10, p. 134783, 2020.
- CINTRA, J. S. Queilite actínica: estudo epidemiológico entre trabalhadores rurais do município de Piracicaba- SP. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, São Paulo, v.67, n.2, p. 118-121, 2013.



- 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, 2010.
- DANCYGER, A. et al. Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. **J Investig Clin Dent.** v. 9, n. 4, p. 12343, 2018.
- de PERES F. F. G. et al. A study of actinic cheilitis treatment by two low-morbidity CO<sub>2</sub> laser vaporization one-pass protocols. **Lasers Med. Sci.** v. 24, p. 375–385, 2009.
- DE SANTANA, Sarmiento D. J. et al., Actinic cheilitis: clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. **Int J Dermatol.** v.53, p. 466-72, 2014.
- DRAGOJ, M. et al. Association of *CCND1* overexpression with KRAS and PTEN alterations in specific subtypes of non-small cell lung carcinoma and its influence on patients' outcome. **Tumor Biol.** v. 36, p. 8773–8780, 2015.
- EGUEZ, L. et al. Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein. **Cell Metab.** v. 2, p. 263–272, 2005.
- EL-NAGGAR, A.K. et al. **World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours.** 4th ed. Lyon: IARC, 2017.
- FORTIER, A.M. et al. Van Themsche C, Asselin E, Cadrin M. Akt isoforms regulate intermediate filament protein levels in epithelial carcinoma cells. **FEBS Lett.** v. 584, n. 5, p. 984-8, 2010.
- GOMES, J. O. et al. CD1a+ and CD83+ Langerhans cells are reduced in lower lip squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.** v. 45, n. 6, p. 433-9, 2016.
- GONZALEZ, E; MCGRAW, T. E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. **Cell Cycle.** v. 8, n. 16, p. 2502-8, 2009.
- GROSZER, M. et al. Negative regulation of neural stem/ progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. **Science.** v. 294, p. 2186–2189, 2001.
- HAN A,Y. et al. Epidemiology of Squamous Cell Carcinoma of the Lip in the United States: A Population-Based Cohort Analysis. **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.** v. 142, p. 1216-23, 2016.
- HARSHA, C. et al. Targeting AKT/mTOR in Oral Cancer: Mechanisms and Advances in Clinical Trials. **Int J Mol Sci.** v. 21, n.9, p. 3285, 2020.
- JADOTTE, Y.T.; SCHWARTZ, R.A. Solar cheilosis: an ominous precursor part II. Therapeutic perspectives. **J Am Acad Dermatol.** v.66, p187–98, 2012b.
- JADOTTE, Y.T.;SCHWARTZ, R.A. Solar cheilosis: an ominous precursor: part I. Diagnostic insights. **J Am Acad Dermatol.** v. 66, p.173–84, 2012a.
- 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- 993, 2006.

KUTTING, B; DREXLER, H. UV-induced skin cancer at workplace and evidence based prevention. **Int Arch Occup Environ Health**. v. 83, n. 8, p. 843-54, 2010.

LI, J. et al. Aberrant CpG island methylation of PTEN is an early event in nasopharyngeal carcinoma and a potential diagnostic biomarker. **Oncol**. v. 31, n. 5, p. 2206-12, 2014.

LOPES, M. L. et al. Clinicopathological profile and management of 161 cases of actinic cheilitis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 90, n. 4, p. 505 -12, 2015.

MARKOPOULOS, A.; KAYAVIS, I. Actinic cheilitis: Clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Diseases**. v. 10, n. 4, p. 212–216, 2004.

MARTIN-BELMONTE, F. et al. PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. **Cell**. v. 128, p. 383–397, 2007.

MOLINARI, F; FRATTINI, M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. **Front Oncol**. v.3, p. 326, 2014.

MONTERO, P. H; PATEL, S. G. Cancer of the oral cavity. **Surg Oncol Clin N Am**. v. 3, p. 491-508, 2015.

NANKIVELL, P. et al. The binary oral dysplasia grading system: validity testing and suggested improvement. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. v. 115, p. 87-94, 2013.

OSAKI, M; OSHIMURA, M; ITO, H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis**. v. 9, n. 6, p. 667-76, 2004.

PAN, H. et al., Overexpression of Circular RNA ciRS-7 Abrogates the Tumor Suppressive Effect of miR-7 on Gastric Cancer via PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. **J Cell Biochem**. v. 119, n. 1, p. 440-446, 2018.

PAN, Q. F. et al. PTEN hypermethylation profiles of Chinese Kazakh patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Dis Esophagus**. v. 27, n. 4, p. 396-402, 2014.

PENG, W. Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. **Cancer Discov**. v. 6, n. 2, p. 202-16, 2016.

PICASCIA, D. D; ROBINSON, J. K. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. **J Am Acad Dermatol**. v. 17, n. 2, p. 255-64, 1987.

PIÑERA-MARQUES, K. et al. Actinic Lesions In Fishermen's Lower Lip: Clinical, Cytopathological And Histopathologic Analysis. **Clinics**, v. 65, n. 4, p. 363-7, 2010.

PORTA, C; PAGLINO, C; MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. **Front Oncol**. v. 14, n. 4, p.64, 2014.

REGEZI JA, SCIUBBA JJ, JORDAN RCK. **Patologia Oral – Correlações Clínico-Patológicas** – Tradução da sexta edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RODRIGUES, A. B; MARTIN, L. G. R; MORAES, M. W. **Oncologia Multiprofissional: patologia, assistências e gerenciamento**. Manole: Barueri - São Paulo, 2016.

SALMENA, L; CARRACEDO, A; PANDOLFI, P. P. Tenets of PTEN tumor suppression. **Cell** v. 133, p. 403–414, 2008.

SANTANA, T et al. Can immunohistochemical biomarkers distinguish epithelial dysplasia degrees in actinic cheilitis? A systematic review and meta-analysis. **Med Oral, Patol Oral y Cir Bucal**. vol. 25, n. 1, p.106-116, 2020.

SCHNUR, J. et al., Aggressive squamous cell carcinoma of the lip. **BMJ Case Rep**. v. 13, n. 12; e239281, 2020

SIDDIQUI, S. et al. A study on promoter methylation of PTEN in sporadic breast cancer patients from North India. **Breast Cancer**. v. 23, n. 6, p. 922-931, 2016.

SILVA, L.V.O. et al. Demographic and Clinicopathologic Features of Actinic Cheilitis and Lip Squamous Cell Carcinoma: a brazilian multicentre study. **Head Neck Pathol**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 899-908, 2020.

SONG M.S; SALMENA, L; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v. 13, n. 5, p. 283-96, 2012.

SONG, L. B. et al. The polycomb group protein Bmi-1 represses the tumor suppressor PTEN and induces epithelial-mesenchymal transition in human nasopharyngeal epithelial cells. **J. Clin. Invest**. v. 119, p. 3626–3636, 2009.

STANKOVIC, T. et al. Comparative analyses of individual and multiple alterations of p53, PTEN and p16 in non-small cell lung carcinoma, glioma and breast carcinoma samples. **Biomed Pharmacother**. v. 68, n. 5, p. 521-6, 2014.

TODD, R; DONOFF R. B; WONG, D. T. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 55, n. 6, p. 613-23, 1997.

TRIMBOLI, A. J. et al. Pten in stromal fibroblasts suppresses mammary epithelial tumours. **Nature**. v. 461, p. 1084–1091, 2009.

TSUCHIYA, A; KANNO, T; NISHIZAKI, T. PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway. **J Endocrinol**. v. 220, n. 1, p. 49-59, 2013.

VADLAKONDA, L.; Dash A, Pasupuleti M, Anil Kumar K, Reddanna P. The Paradox of Akt-mTOR Interactions. **Front Oncol**. v. 20; n. 3, p. 165, 2013.

VIEIRA , R. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 87, n. 1, p. 105 -14, 2012.

YAN, F. et al. Grading systems of oral cavity pre-malignancy: a systematic review and meta-analysis. **Eur Arch Otorhinolaryngol**. v. 277, p. 2967–2976, 2020.

YARI, K; PAYANDEH, M; RAHIMI, Z. Association of the hypermethylation status of PTEN tumor suppressor gene with the risk of breast cancer among Kurdish population from Western Iran. **Tumour Biol**. v.37, n. 6, p. 8145-52, 2016.

ZINI, A; CZERNINSKI, R; SGAN-COHEN, H. D. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. **J Oral Pathol Med.** v. 39, n. 4, p. 299-305, 2010.