

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

DÉBORA DE OLIVEIRA SANTOS

ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA WNT E  
HEDGEHOG NA CARCINOGENESE BUCAL EM CAMUNDONGOS  
*WILD-TYPE* E *KNOCKOUT* PARA O GENE DA GALECTINA-3

UBERLÂNDIA

2013

DÉBORA DE OLIVEIRA SANTOS

ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA WNT E  
HEDGEHOG NA CARCINOGENESE BUCAL EM CAMUNDONGOS  
*WILD-TYPE* E *KNOCKOUT* PARA O GENE DA GALECTINA-3

**Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Biologia Celular  
e Estrutural Aplicadas da Universidade  
Federal de Uberlândia, como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério de  
Faria**

Uberlândia

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S237e  
2013

Santos, Débora de Oliveira, 1988-

Estudo da expressão de proteínas da via Wnt e Hedgehog na carcinogênese bucal em camundongos *wild-type* e *knockout* para o gene da galectina-3 / Débora de Oliveira Santos. -- 2013.

83 f. : il.

Orientador: Paulo Rogério de Faria.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Boca - Câncer - Teses. 3. Proteínas - Teses. I. Faria, Paulo Rogério de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 576.3



*Dedico este trabalho a minha querida avó Maria Amélia, que foi minha segunda mãe, minha grande amiga e será sempre a minha maior saudade.*

## AGRADECIMENTOS

*Neste momento me parece tão pouco dizer apenas “muito obrigada”.*

*Agradeço primeiramente a Deus, por sua bondade e amor incondicional.*

*À minha mãe, Marlene Amélia, pelo exemplo, pela dedicação, por nunca medir esforços mesmo em frente às adversidades.*

*A toda minha família, em especial minhas irmãs Danúbia e Daniela, meu pai Walter, e meus Tios Carlos e Soraia.*

*Às minhas amigas de longa data, Pollyanna, Ana Luisa e Andressa, minhas irmãs de coração, que estiveram presentes em tantos momentos especiais da minha vida, e neste não foi diferente.*

*Aos amigos Daniel, Taís e Moline. Juntos nós passamos por momentos inesquecíveis durante a graduação e o mestrado. Independente do caminho que cada um seguir, continuarei torcendo por vocês. Obrigada por tudo amigos!*

*A minha amiga Fernanda, cuja amizade foi um dos melhores presentes do mestrado.*

*Ao meu orientador, Prof. Paulo Rogério, obrigada pela confiança, cuidado e paciência, aprendi muito com o seu exemplo de profissionalismo e comprometimento com o trabalho.*

*À Profa Karen, minha primeira orientadora, hoje uma amiga querida. Obrigada pelos conselhos tão valiosos e pela disposição em ajudar sempre que preciso.*

*Ao Prof. Sérgio Vitorino, que me abriu as portas de seu laboratório, obrigada por acreditar em meu potencial e por todas as palavras de incentivo.*

*Aos amigos do Laboratório de Patologia: Laís, Tamiris, Gabriela, João Paulo, Talita, Silas e Ângela. Sentirei saudades da nossa convivência diária.*

*E por fim, agradeço a todos os colegas do programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e Estrutural aplicadas.*

*Muito obrigada a todos vocês!*

*“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim:  
esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois  
desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”*

*João Guimarães Rosa*



## RESUMO

O carcinoma epidermóide (CE) é a neoplasia mais comum da cavidade oral e a cada ano mais de 300.000 novos casos são diagnosticados em todo o mundo. Para compreender as alterações moleculares associadas ao seu desenvolvimento, bem como para identificar marcadores diagnósticos e prognósticos para CE, muitos trabalhos têm utilizado modelos de carcinogênese bucal em animal desafiados com o carcinógeno 4-Nitroquinoline-1-Oxide (4NQO). A galectina-3 (Gal-3) é uma proteína pertencente à família das lectinas que apresenta a capacidade de modular vias de sinalização intracelular, como a via Wnt/ $\beta$ -catenina. Além disso, a Gsk-3 $\beta$ , uma importante proteína reguladora dessa via, tem capacidade de controlar os níveis citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina, e inativar proteínas efetoras da via de sinalização Hedgehog (Hh), como as proteínas da família Gli. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas ativadoras da via Wnt/ $\beta$ -catenina Wnt-1 e Wnt-3A, bem como das proteínas Gli-3 e Shh pertencentes à via de sinalização Hh em amostras de displasias e carcinomas oriundas de língua de camundongos *wild-type* (WT) e *knockout* (KO) para o gene da Gal-3 desafiados com o carcinógeno 4NQO. Para análise da expressão dessas proteínas, um método semiquantitativo foi empregado. Todas as amostras foram negativas para Wnt-1 em ambos os grupos. A média positividade para a proteína Wnt-3A foi sempre maior no grupo WT, mas a diferença encontrada entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa ( $p=0,04$ ). Por outro lado, a expressão de Shh foi sempre significativamente maior grupo WT em relação ao KO tanto nas displasias quanto nos carcinomas ( $p< 0,0001$ ). Além disso, a expressão de Shh foi associada com transformação maligna de epitélio lingual apenas no grupo WT. Em relação a Gli-3, a média de positividade diminuiu na evolução das displasias para carcinomas no grupo WT, enquanto que no grupo KO foi observado um discreto aumento, mas nenhuma diferença foi alcançada. Em conclusão, os resultados sugerem que a Gal-3 não interfere na ativação via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, estando ativada em ambos os grupos. Além disso, a via de sinalização Hh desempenha um papel importante na transformação maligna do epitélio lingual de camundongos WT, mas no grupo KO.

**Palavras chave:** carcinogênese bucal, galectina-3, camundongos, via de sinalização Hedgehog, via de sinalização Wnt.

## ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common neoplasm of the oral cavity and each year more than 300.000 new cases are diagnosed worldwide. To understand the molecular alterations associated with its development as well as to identify diagnostic and prognostic markers for this tumor, lots of studies have used mouse model of oral carcinogenesis challenged with the carcinogen 4-Nitroquinoline-1-Oxide (4NQO). Galectin-3 (Gal-3) is a lectin that has the hability to modulate intracellular signaling pathways, such as the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. Furthermore, the Wnt/ $\beta$ -catenin-regulated protein GSK-3 $\beta$  is able to control cytoplasmic level of  $\beta$ -catenin and also inactivate effector proteins of the Hedgehog (Hh) signaling pathway including Gli proteins. The aim of this study was evaluate by immunohistochemistry Wnt-1 and Wnt-3A expression, both responsible to activate the Wnt/  $\beta$ -catenin pathway, and Shh and Gli-3 expression, two proteins belonging to the Hh signaling pathway, in samples of dysplasia and carcinomas developed in tongue from *wild-type* (WT) and *Gal-3-knockout* (KO) mice challenged by the carcinogen 4NQO. To analyze the expression of these proteins, a semiquantitative method was employed. All samples of dysplasia and carcinoma were negative for Wnt-1 protein in both groups of mice. The average of positivity for Wnt-3A protein was higher in the WT group, but no difference was found between the two groups ( $p=0,04$ ). Shh expression was always statistically significant in the WT group when compared to the KO group both in dysplasia as carcinoma ( $p<0.0001$ ). Furthermore, Shh expression was associated with malignant transformation of tongue epithelium only in the WT group. With regard to Gli-3 protein, its expression decreased from dysplasia to carcinoma in the WT group, whereas in the KO group it was observed a slight increased, but no difference was achieved. In conclusion, the results suggest that absence of Gal-3 does not interfere in the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway activation. Also, the Hh signaling pathway plays an important role in the malignant transformation of tongue epithelium from WT mice, but not in KO mice.

**Keywords:** oral carcinogenesis, galectin-3, mice, hedgehog signaling pathway, Wnt signaling pathway.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** Expressão imunoistoquímica de Wnt-3A. A: Animal WT, displasia moderada, na qual se observa moderada marcação nuclear e citoplasmática; B: Animal WT, carcinoma, com moderada marcação nuclear e citoplasmática; C: Animal KO, displasia leve, na qual se observa fraca marcação citoplasmática predominante nas células não alteradas; D: Animal KO, carcinoma, no qual se observa moderada marcação nuclear e citoplasmática (aumento de 400X).....43
- FIGURA 2-** A: Expressão de Wnt-3A no grupo WT (teste U de Mann- Whitney,  $p=0,9788$ ); B: Expressão de Wnt-3A no grupo KO (teste de Mann- Whitney,  $p=0,3646$ ); D: Displasia; CA: Carcinoma; (+): média.....44
- FIGURA 3-** A: Expressão de Wnt-3A no grupo WT (teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,3719$ ); B: Expressão de Wnt-3A no grupo KO (teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,6772$ ); DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma. (+): média.....45
- FIGURA 4-** Análise comparativa da expressão de Wnt-3A entre os grupos WT e KO (Teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,04$ ); DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma; (+): média.....45
- FIGURA 5-** Expressão imunoistoquímica de Shh. A: Animal WT, displasia leve, na qual se observa marcação citoplasmática moderada; B: Animal WT, carcinoma com moderada marcação citoplasmática; C: Animal KO, displasia leve, na qual se observa fraca marcação citoplasmática; D: Animal KO, carcinoma, mostrando ausência de marcação (aumento de 400X).....46
- FIGURA 6-**A: Expressão de Shh no grupo WT (teste U de Mann- Whitney,  $p=0,0037$ ); B: Expressão de Shh no grupo KO (teste de Mann- Whitney,  $p=0,7419$ ); D: Displasia; CA: Carcinoma; (+): média.....47
- FIGURA 7-** A: Expressão de Shh no grupo WT (teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,001$ ); B: Expressão de Shh no grupo KO (teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,33$ ); DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma; (+): média.....48
- FIGURA 8-** Análise comparativa da expressão de Shh entre os grupos WT e KO (teste de Kruskal-Wallis,  $p<0,0001$ ). DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma; (+): média.....48

**FIGURA 9-** Expressão imunoistoquímica de Gli-3. A: Animal WT, displasia grave com intensa marcação citoplasmática e nuclear; B: Animal WT, carcinoma com moderada marcação citoplasmática; C: Animal KO, displasia moderada, na qual se observa marcação da membrana plasmática das células mais superficiais do epitélio; D: Animal KO, carcinoma, no qual se observa fraca marcação citoplasmática (aumento de 400X).....49

**FIGURA 10-** A: Expressão de Gli-3 no grupo WT (teste de Kruskal-Wallis,  $p= 0,27$ ); B: Expressão de Gli-3 no grupo KO (teste de Kruskal-Wallis,  $p= 0,49$ ); DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma; (+): média.....50

**FIGURA 11-**Análise comparativa da expressão de Gli-3 entre os grupos WT e KO (teste de Kruskal-Wallis); DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma; (+): média.....50

## **LISTA DE TABELAS E QUADROS**

<b>TABELA 1-</b> Critério de classificação das displasias de acordo com o grau histológico, como descrito por Lumerman et al (1995).....	38
<b>TABELA 2</b> -Classificação histológica dos CE baseada em critérios de diferenciação tecidual neoplásica recomendado pela Organização Mundial da Saúde, 2005.....	38
<b>TABELA 3-</b> Anticorpos utilizados e suas respectivas concentrações.....	39
<b>QUADRO 1-</b> Parâmetros para avaliação da imunoistoquímica nas displasias e carcinomas.....	40
<b>TABELA 4-</b> Número de lesões analisadas para cada anticorpo tanto no grupo WT quanto no KO.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**4HAQO:** 4-Hidroxiaminoquinolona -N- Oxide

**4NQO:** 4-Nitroquinoline-1-Oxide

**APC:** do inglês, *Adenomatous Poliposis Coli*

**CE:** Carcinoma Epidermóide

**CKI:** Caseína Quinase I

**CME:** Carcinoma Mucoepidermóide

**DCR:** Domínio de Reconhecimento de Carboidratos

**Dhh:** Desert Hedgehog

**Dkk:** Dickkopf

**Dsh:** Dishevelled

**EDTA:** do inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

**FZ:** Frizzled

**Gal-3:** Galectina-3

**Gli:** Do inglês, *Glioma-associated oncogene homolog*

**GSK-3 $\beta$ :** Glicogênio Sintetase Quinase- 3 $\beta$

**Hh:** Hedgehog

**Ihh:** Indian Hedgehog

**kDa:** Quilidaltón

**KO:** Knockout

**LOH:** Do inglês, *Loss of Heterozygosity*

**MMP:** Metaloproteinase

**Ptch:** Patched

**Shh:** Sonic Hedgehog

**Smo:** Smoothened

**SUFU:** do inglês, *Supressor of Fused*

**TRIS:** Tris (hidroximetil) aminometano

**WIF-1:** Fator inibitório de Wnt-1

**Wnt:** Do inglês, *Wigless-Type MMTV integration site family*

**WT:** Wild-Type

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	16
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 CARCINOGENESE BUCAL .....	19
2.2 GALECTINA-3 .....	20
2.3 VIA DE SINALIZAÇÃO WNT.....	25
2.4 AS GLICOPROTEÍNAS WNTS. ....	29
2.5 VIA DE SINALIZAÇÃO SONIC HEDGEHOG..	31
3- OBJETIVO.....	35
4- MATERIAL E MÉTODOS. ....	36
4.1 GRUPO DE ESTUDOS.....	36
4.1.1 PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DO 4NQO.....	36
4.1.2 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS,DISSECAÇÃO DA LÍNGUA E OBTENÇÃO DOS PREPARADOS HISTOLÓGICOS.....	37
4.1.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA PARA A DETECÇÃO DAS DISPLASIAS E DOS CARCINOMAS.....	37
4.2IMUNOISTOQUÍMICA.....	39
4.3 ANÁLISE DA IMUNOISTOQUÍMICA.....	40
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5- RESULTADOS ..	42
5.2.1 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS WNT-1 E WNT-3A.....	42
5.2.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS SHH E GLI-3.....	46
6- DISCUSSÃO.....	51
7- CONCLUSÃO .....	57
REFERÊNCIAS .....	58
ANEXO A: TABELA COM SCORE MÉDIO DE CADA LESÃO ANALISADA .....	72
ANEXO B : TABELAS DA ESTATÍSTICA DESCRITIVA PARA CADA ANTICORPO .....	77
ANEXO C: TABELAS MOSTRANDO A ESTATÍSTICA DO PÓS- TESTE DE DUNN.....	78
ANEXO D- CÓPIA DA APROVAÇÃO CEUA-UFU.....	83

## 1- INTRODUÇÃO

As neoplasias de cavidade oral representam quase 3% dos casos de câncer em todo mundo e, deste total, mais de 90% são carcinoma epidermóide (CE) (JEMAL et al., 2008; SILVA et al., 2011). A cada ano mais de 300.000 novos casos de CE são diagnosticados mundialmente e embora avanços no tratamento tenham sido observados nas últimas décadas, o prognóstico ainda continua ruim, o que em parte está relacionado ao atraso no diagnóstico como também a falta de biomarcadores plasmáticos e teciduais específicos que auxiliam na detecção precoce da doença (PISANI et al., 2002; KANOJIA, VAIDYA, 2006; MOLINOLO et al., 2009).

Nesse sentido, para compreender as alterações moleculares associadas ao desenvolvimento de CE de cavidade bucal, muitos trabalhos têm utilizado modelos experimentais em animais (EVERSON, 1981; NAUTA et al., 1996; LIU et al., 1999; TANG et al., 2004; CHEN; LIN, 2010). Nesses modelos, substâncias carcinogênicas são utilizadas para indução tumoral, com o 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), o mais empregado devido a sua capacidade de promover estresse oxidativo intracelular levando a formação de adutos de DNA, um dos responsáveis pelo desenvolvimento de alterações potencialmente malignas e malignas (KANOJIA; VAIDYA, 2006). Assim, o uso desses modelos é de fundamental importância para a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à iniciação e à promoção tumoral, em especial na busca de marcadores preditivos de malignização do tecido epitelial bucal.

As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos, reconhecendo estruturas específicas de oligossacarídeos presentes em glicoproteínas e glicolípidos de superfície celular e matriz extracelular (LIU; RABINOVICH, 2005). Dentre os membros dessa superfamília, têm-se as galectinas, um subtipo de lectina que possui alta afinidade por resíduos de  $\beta$ -galactosídeos (MARKOWSKA et al., 2010). Até o presente momento, 15 diferentes tipos de galectinas foram identificados em mamíferos e essas lectinas apresentam papéis em diversas atividades biológicas tanto no meio extracelular, interagindo com glicoproteínas da matriz extracelular, quanto no meio intracelular (LIU; RABINOVICH, 2005). Dentre os diferentes membros dessa família, a galectina-3 (Gal-3) é a mais estudada por estar envolvida em diferentes processos fisiológicos e também patológicos. Nesse aspecto, a literatura específica tem mostrado que a Gal-3 está implicada com desenvolvimento tumoral, sobrevivência celular, proliferação celular, angiogênese, metástase e ativação de vias de sinalização intracelular, como a



via Wnt (do inglês *wingless-type MMTV integration site family*) (SHIMURA et al., 2004; LIU, F.T; RABINOVICH, G.A. 2005). Embora a Gal-3 possa apresentar diferentes funções, muitas relacionadas à biologia tumoral, o seu papel no desenvolvimento de CE ainda não está muito claro. Sobre isso, em um trabalho recente, Faria e colaboradores (2011) mostraram que a ausência de Gal-3 não afetou de maneira significativa a incidência de carcinomas em línguas de camundongos *knockout* (KO) quando comparados com animais *wild-type* (WT), sugerindo um papel secundário na formação desse tumor em língua de camundongos (FARIA et al., 2011)

A via de sinalização Wnt está implicada em uma grande variedade de processos celulares normais, incluindo embriogênese e diferenciação (GILES VAN ES; CLEVES, 2003). Além disso, vários estudos têm mostrado que a ativação contínua dessa via de sinalização está diretamente relacionada com transformação maligna, inclusive de CE de cavidade bucal (GILES VAN ES; CLEVES, 2003; SAYANS et al., 2012;). Glicoproteínas ativadoras dessa via, conhecidas como Wnts, ligam-se a receptores de superfície celular pertencentes à família Frizzled (FZ) para promover a estabilização de uma proteína chave conhecida como  $\beta$ -catenina (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004). Assim, na ausência de ligantes Wnts, o *pool* citoplasmático de  $\beta$ -catenina é continuamente degradado como resultado da sua fosforilação pela proteína glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) e subsequente degradação pela via ubiquitina-proteossomo (HAGEN; PUIG, 2002). Diferente disso, na presença das proteínas Wnts, o complexo de destruição APC-Axina-GSK-3 $\beta$  é inativado e a  $\beta$ -catenina estabilizada no citoplasma, onde é transportada ao núcleo ligada à Gal-3 para promover a ativação da transcrição de genes tais como MYC e CCND1 (SHIMURA et al., 2004; DAKENG et al., 2012).

Sobre isso, é postulado que a presença de Gal-3 é imprescindível para o deslocamento de  $\beta$ -catenina ao núcleo. Contudo, foi demonstrado por Santana e colaboradores (2011) que a ausência de Gal-3 em animais KO não afetou sua distribuição celular. Nesse estudo, a presença de  $\beta$ -catenina não membranosa foi observada tanto em camundongos WT quanto KO, sugerindo ativação da via Wnt nos dois grupos (SANTANA et al., 2011). Por outro lado, não há nenhum estudo avaliando comparativamente a expressão de proteínas Wnts no modelo de carcinogênese bucal em camundongos WT e KO para confirmar esses achados preliminares.

Similar à via de sinalização Wnt, a via Hedgehog (Hh) também possui um papel central no desenvolvimento embrionário, especialmente regulando a proliferação e diferenciação celular (BEACHY et al., 2004). Nos mamíferos, três ligantes homólogos dessa via foram identificados: Sonic (Shh), Indian (Ihh) e Desert (Dhh). Essas proteínas se ligam a um complexo receptor de membrana que leva a ativação de fatores de transcrição da família Gli para iniciar a transcrição de genes alvos, cujos produtos proteicos estão envolvidos no controle do ciclo celular (ALTABA, 1999; XUAN et al., 2006; TANG et al., 2007). Esses fatores de transcrição podem ser fosforilados e inativados por GSK-3 $\beta$ , uma molécula que atua regulando as vias de sinalização Wnt e a Hh, estabelecendo uma relação entre elas (MIZUARAI et al., 2009; MIMEAULT; BATRA, 2010). Além disso, foi demonstrado que a sinalização Hh ativa está diretamente relacionada com a quantidade de GSK-3 $\beta$  inativa (MILL et al. 2005). Sobre a GSK-3 $\beta$  inativa, um trabalho realizado em nosso laboratório mostrou que a expressão de GSK-3 $\beta$  inativa estava significante associada com transformação maligna de epitélio lingual de camundongos WT, mas não em camundongos KO (MENDONÇA et al. 2012). Se isso for o caso, é possível supor que a via Hh esteja mais ativa em camundongos WT devido à ausência de regulação das proteínas Gli pela GSK3- $\beta$ .

Assim, tomando em consideração tudo que foi exposto anteriormente, o objetivo deste trabalho foi identificar possíveis diferenças na ativação das vias de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e Hh em um modelo de carcinogênese bucal induzida experimentalmente em camundongos WT e KO para o gene da Gal-3 desafiados com o carcinógeno 4NQO. Nossa hipótese é que não haja diferença na expressão de proteínas ativadoras da via de sinalização Wnt nos dois grupos de camundongos e que a via de sinalização Hh esteja mais ativa em camundongos WT, em especial no processo de transformação maligna do epitélio lingual.

## **2-REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1- Carcinogênese bucal**

Cerca de 3% dos casos de câncer em todo mundo são originários de cavidade bucal, com o carcinoma epidermóide (CE) representando aproximadamente 90% do total (SILVA et al., 2011). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa da incidência de CE para o ano de 2012 no Brasil foi de 9.990 novos casos em homens e 4.180 novos casos em mulheres, colocando-o entre os 10 cânceres mais comuns na população brasileira (INCA, 2012). No contexto mundial, dados atuais mostram que a cada ano mais de 300.000 novos casos de CE oral são diagnosticados em todo mundo (PISANI et al., 2002; KANOJIA; VAIDYA, 2006; JEMAL et al., 2008). Os principais fatores de risco associados ao seu desenvolvimento são o tabagismo e o etilismo (MOLINOLO et al., 2009). Esse tumor é caracterizado por apresentar um crescimento infiltrativo e precoce desenvolvimento de metástases para linfonodos regionais (SILVA et al., 2011). Nas últimas décadas, embora tenha havido um enorme avanço no tratamento desse tumor, a taxa de sobrevida dos pacientes ainda é considerada baixa, pois a maioria dos casos é diagnosticada em estágios avançados (JEMAL et al., 2008; MOLINOLO et al., 2009).

É amplamente aceito na literatura que o desenvolvimento desse tumor ocorre em etapas, com a maioria dos casos originando da transformação de lesões potencialmente malignas (REIBEL, 2003). Neste sentido, a lesão potencialmente maligna mais conhecida é a leucoplasia, cuja taxa de transformação maligna varia entre 1% e 28%, sendo a displasia um dos fatores preditivos mais importantes nesse processo de malignização (SILVERMAN et al., 1984; SCHEPMAN et al., 1998; NEVILLE et al., 2002; REIBEL, 2003; BOUQUOT et al., 2006). O diagnóstico de displasia ainda é um tanto subjetivo, especialmente no que diz respeito a sua gradação histológica bem como na identificação das lesões que de fato terão grande potencial de sofrer transformação maligna (MANCHANDA et al., 2012). A identificação de marcadores para auxiliar o patologista em estabelecer um correto diagnóstico bem como em prever quais lesões sofrerão malignização permitirá que casos novos de CE sejam diagnosticados em estágio inicial, melhorando a taxa de sobrevida desses pacientes (REIBEL, 2003).

Nesse sentido, a utilização de modelos de carcinogênese bucal em animais, como ratos e camundongos, tem se tornado uma ferramenta de grande valor, pois

permite a reprodução das diferentes fases relacionadas à transformação maligna do epitélio de cavidade bucal, bem como o estudo das alterações morfológicas, genéticas e bioquímicas que ocorrem nas lesões displásicas e carcinomas (KANOJIA, VAIDYA, 2006).

Na literatura científica é possível encontrar diferentes tipos de modelos experimentais em animais desafiados com carcinógenos (KANOJIA, VAIDYA, 2006). Contudo, dentre os diferentes tipos de modelos, aqueles que usam o carcinógeno 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) são os mais utilizados. Bioquimicamente, o 4NQO é um carcinógeno químico solúvel em água que induz todas as etapas da carcinogênese, ou seja, hiperplasias, papilomas, displasias em diferentes graus, carcinoma *in situ* e carcinoma, em um padrão similar ao observado na carcinogênese oral humana (NAUTA et al 1996; KANOJIA, VAIDYA, 2006). Os efeitos carcinogênicos do 4NQO são decorrentes da redução enzimática do seu grupo nitro presente em um dos anéis aromáticos, seguida pela formação de um composto enzimático intermediário conhecido como 4-hidroxi-aminoquinolona-N-óxido (4HAQO) (STANLEY et al., 1992; MIRZAYANS et al., 1999). Este composto exerce um potente estresse oxidativo intracelular, gerando a formação de espécies reativas de oxigênio, tais como o peróxido de hidrogênio e o radical superóxido, os quais são capazes de provocarem adutos de DNA (NUNOSHIBA; DEMPLE, 1993; ARIMA et al., 2006; KANOJIA, VAIDYA, 2006). Sabe-se também que o 4HAQO reage preferencialmente com resíduos de guanina do DNA, promovendo a sua substituição por uma pirimidina, em um padrão semelhante ao observado pela ação dos raios ultravioletas do sol e por alguns compostos presentes no tabaco (KANOJIA, VAIDYA, 2006).

Assim, é possível dizer que a utilização desses modelos para a compreensão dos processos relacionados à formação de tumores na cavidade bucal é de extrema importância para desvendar os mecanismos moleculares subjacentes a este processo como também para auxiliar na busca de novos tratamentos para pacientes acometidos por CE.

## **2.2- Galectina-3**

Lectinas são proteínas ligadoras de carboidratos que reconhecem estruturas específicas de oligossacarídeos presentes em glicoproteínas e glicolípídeos de superfície celular bem como de matriz extracelular (LIU, F.T; RABINOVICH, G.A. 2005).

Pertencente a essa família, tem-se as galectinas, proteínas que possuem alta afinidade por resíduos de  $\beta$ -galactosídeos de superfície celular e apresentam pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidratos (DCRs) (MARKOWSKA et al., 2010). No momento, 15 diferentes tipos de galectinas foram identificados em mamíferos, as quais podem ser subdivididas em três grupos de acordo com o número de DCRs: o grupo protótipo, formado pelas galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15, cuja estrutura final da proteína é composta por uma sequência N-terminal curta e um único DCR; o grupo repetição em tandem, representado pelas galectinas 4, 6, 8, 9 e 12, as quais se caracterizam pela presença de dois DCR não idênticos unidos por uma sequência curta de cerca de 70 aminoácidos; e, por fim, o grupo químera, cujo representante único é a galectina-3 (Gal-3) (CHIARIOTTI et al., 1999; LIU; RABINOVICH, 2005).

A Gal-3 é um dos membros mais estudados e foi primeiramente identificada como um marcador de diferenciação macrófaga denominado de Mac-2 (NEWLACZYL; YU, 2011). Trata-se de uma proteína de 31kDa estruturalmente composta por dois domínios distintos: um domínio N-terminal composto por 12 aminoácidos, uma sequência rica em aminoácidos glicina, prolina e tirosina, e um domínio C-terminal, contendo cerca de 130 aminoácidos e que contém o DCR responsável pela sua atividade de lectina (TAKENAKA; FUKUMORI; RAZ, 2004).

A Gal-3 é expressa em diferentes tecidos humanos, incluindo células do sistema imunológico (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos), células epiteliais, tais como células do epitélio gastrointestinal, trato respiratório e renal, e também em células neuronais (ÇAY, 2012). A sua secreção parece ocorrer por uma via não clássica, visto que não possui uma sequência sinal comum às proteínas que são secretadas pela via clássica (HAUDEK et al., 2011). Assim como outros membros dessa família, a Gal-3 pode ser encontrada tanto no meio intracelular (núcleo e citoplasma) quanto no meio extracelular (NEWLACZYL; YU, 2011). No núcleo, a Gal-3 está envolvida em processos de *splicing* do pré-RNAm, regulação do crescimento celular e progressão do ciclo celular, enquanto no citoplasma parece atuar regulando a apoptose e vias de sinalização intracelular (LIU; PATTERSON; WANG, 2002; LIU; RABINOVICH, 2005). No meio extracelular, esta lectina liga a glicoconjugados de superfície celular e a proteínas de matriz extracelular, como a laminina, fibronectina e elastina, modulando positivamente a adesão celular (HUGHES, 2001).

No contexto das neoplasias, vários trabalhos têm mostrado que a Gal-3 está implicada no desenvolvimento de tumores malignos, pois tem um papel importante na

regulação de diferentes processos patofisiológicos que contribuem para a tumorigênese, progressão tumoral e metástases (TANENAKA, et al., 2004; NEWLACZYL; YU, 2011). Em parte, isso se deve a sua capacidade de interação com a proteína RAS (LIU; RABINOVICH, 2005). O seu potencial tumorigênico também pode ser evidenciado pela sua capacidade de interagir com a proteína  $\beta$ -catenina, uma proteína efetora chave da via de sinalização Wnt, e promover a transcrição de genes alvos reguladores da proliferação celular, como CCND 1 e MYC (NEWLACZYL; YU, 2011).

No que diz respeito ao seu papel na apoptose, estudos prévios têm mostrado que a Gal-3 pode exercer tanto um papel pró-apoptótico quanto anti-apoptótico, na dependência do tipo e localização celular (YANG et al., 1996; AKAHANI et al., YU et al., 1997; NAKAHARA et al., 2005; DUMIC et al., 2006). O seu papel anti-apoptótico se dá pelo fato de que é translocada para a membrana mitocondrial inibindo a liberação do citocromo c, uma importante molécula ativadora da caspase-3 (YU et al., 2002). Por outro lado, foi relatado que a Gal-3 extracelular pode induzir a apoptose em célula T de linhagens celulares de leucemia e em células mononucleares humanas do sangue periférico através da sua ligação com glicoconjugados de superfície celular (FUKUMORI et al., 2003).

Assim, considerando o seu papel chave em diferentes aspectos da biologia tumoral, a Gal-3 tem sido implicada principalmente como marcador de prognóstico em diferentes tumores, como CE de cabeça e pescoço (GILLENWATER et al., 1996), carcinoma da tireóide (XU et al., 1995) e carcinoma colorretal (BARROW et al., 2011). Em lesões tireoidianas, Chiu e colaboradores (2010) observaram que a Gal-3 estava altamente expressa em carcinomas, mas não em tecidos normais, sendo raramente expressa nas lesões benignas (CHIU et al., 2010; ÇAY, 2012). Em amostras de carcinoma de cólon, Wu e Gan (2007) comparando a expressão de Gal-3 por imunoistoquímica em amostras com e sem metástases, observaram que a expressão de Gal-3 era muito maior nos tumores metastáticos e sugeriram que, nesse tipo de tumor, uma maior expressão de Gal-3 parece ter um papel no desenvolvimento de metástase como também no prognóstico (WU; GAN, 2007). De forma similar, Miyazaki e colaboradores (2002) avaliaram a expressão imunoistoquímica desta lectina em casos de carcinomas gástricos não metastáticos e metastáticos e concluíram também que a expressão de Gal-3 era significativamente mais forte nos casos metastáticos e, portanto, associada com pior prognóstico (MIYAZAKI et al, 2002).

Em contraste com os trabalhos supracitados, em alguns tumores a expressão de Gal-3 parece estar inversamente associada com a ocorrência de metástase, sugerindo que fatores teciduais ou tumorais específicos sejam determinantes na modulação de suas funções (TAKENAKA; FUKUMORI; RAZ, 2004). Sobre isso, Castronovo e colaboradores (1996), avaliando a expressão imunoistoquímica de Gal-3 em amostras de câncer de mama e de tecido adjacente normal, encontraram uma expressão significativamente maior de Gal-3 no tecido normal do que nas amostras tumorais, especialmente nos casos metastáticos (CASTRONOVO et al., 1996).

Com relação ao seu papel em CE de cavidade bucal, Faria e colaboradores (2011) investigaram a influência dessa lectina no desenvolvimento de carcinomas de língua em camundongos WT e KO para o gene da Gal-3 submetidos ao tratamento com o carcinógeno 4NQO. Os resultados indicaram que a ausência desta lectina parece não influenciar no processo de carcinogênese bucal (FARIA et al., 2011). Em contraste, Honjo e colaboradores (2000), avaliando a expressão da Gal-3 em amostras de CE de língua e a sua relação com prognóstico, observaram uma redução na expressão nuclear e um aumento da expressão citoplasmática de Gal-3 na transformação do epitélio normal a carcinoma, sugerindo que essa mudança poderia estar relacionada com o desenvolvimento desse tumor. Além disso, uma maior expressão citoplasmática de Gal-3 foi associada com uma redução da sobrevida dos pacientes, sugerindo um papel de marcador de prognóstico para Gal-3 citoplasmática (HONJO et al., 2000).

Sobre o papel da Gal-3 na via de sinalização Wnt, as primeiras observações sobre a sua atividade reguladora nessa via foram feitas por Shimura e colaboradores (2004). Nesse estudo, foi demonstrado que a Gal-3 é capaz de se ligar à  $\beta$ -catenina, auxiliando-a na translocação do citoplasma para o núcleo para iniciar a ativação de genes alvos (SHIMURA et al., 2004). Um ano depois, o mesmo grupo mostrou uma semelhança estrutural entre  $\beta$ -catenina e Gal-3, uma sequência consenso comum denominada de S92XXXS96, a qual serve como local de fosforilação pela GSK-3 $\beta$ . (SHIMURA et al., 2005).

Após essas descobertas iniciais, vários outros estudos têm buscado avaliar as funções Gal-3 na via de sinalização Wnt no contexto diferentes tumores. Nesse aspecto, Song e colaboradores (2009) avaliaram a influência da Gal-3 na regulação da via de sinalização Wnt em linhagens celulares de carcinoma de cólon. Nesse estudo, usando a tecnologia de RNA de interferência, os autores mostraram que a ausência da Gal-3

reduziu os níveis da proteína  $\beta$ -catenina e de ciclina D1, sem redução dos níveis de mRNA de  $\beta$ -catenina, sugerindo que a Gal-3 poderia interferir nos níveis de  $\beta$ -catenina por um mecanismo pós-traducional. Além disso, foi notado nas células com níveis elevados de Gal-3 um acúmulo de  $\beta$ -catenina no núcleo e aumento da atividade do fator de transcrição LEF1/TCF4 (do inglês: *T-cell-specific factor/lymphoid enhancer binding factor*), os quais são importantes na ativação dos genes alvos dessa via. Além disso, na ausência da Gal-3, uma redução das formas fosforiladas, ou seja, inativas, das proteínas Akt e GSK-3 $\beta$  foi observada, sugerindo que ela poderia estar regulando a via de sinalização Wnt pela fosforilação de proteínas-alvo como a GSK-3 $\beta$  (SONG et al., 2009).

Esse fenômeno também foi observado por Kobayashi e colaboradores (2011). Nesse estudo, ao inibirem a expressão Gal-3 utilizando a tecnologia de RNA de interferência em linhagens celulares de câncer de pâncreas, observaram uma redução da migração e invasão celular, bem como dos níveis de MMP-2, de  $\beta$ -catenina e das formas fosforiladas de Akt e GSK-3 $\beta$ , com consequente aumento de suas funções (KOBAYASHI et al., 2011). Resultados parecidos foram encontrados em CE de cavidade oral (ZHANG et al., 2012). Nesse estudo, Zhang e colaboradores (2012), ao silenciarem Gal-3 em linhagens celulares de CE usando RNA de interferência, observaram redução na migração e invasão celular, o que foi acompanhado pela menor expressão de MMP-9, como também de  $\beta$ -catenina e das formas fosforiladas de Akt e GSK-3 $\beta$  (ZHANG et al., 2012).

Embora isso possa ser o caso para a maioria dos trabalhos realizados com cultura celular, um estudo realizado por Santana e colaboradores (2011) mostraram que, tanto em camundongos WT quanto nos KO para Gal-3, havia uma elevada expressão de  $\beta$ -catenina não membranosa (nuclear e citoplasmática) nas lesões displásicas e carcinomas, indicando ativação da via em ambos os grupos. Além disso, esse resultado também mostrou que a ausência Gal-3 poderia não comprometer funcionalmente a via Wnt nesse modelo experimental (SANTANA et al., 2011). Contudo, para confirmar se a via de sinalização Wnt esteja, de fato, ativa em camundongos WT e KO no contexto desse modelo, o estudo da expressão de proteínas Wnts ativadoras dessa via se faz necessário.



### 2.3- Via de sinalização Wnt

A via de sinalização Wnt participa da regulação de uma grande variedade de processos fisiológicos em diferentes espécies de animais, tendo um papel crucial no desenvolvimento embrionário (KLAUS; BIRCHMEIER, 2008). As Wnts constituem uma família de glicoproteínas secretadas, ricas em aminoácido cisteína, com aproximadamente 350-400 aminoácidos. Nos seres humanos, existem 19 membros conhecidos dessa família, os quais desempenham papéis essenciais na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (GILES; VAN ES; CLEVES, 2003; MacDONALD; TAMAI; HE, 2009).

A transdução de sinal se inicia com a ligação das glicoproteínas Wnts a dois membros distintos de receptores de superfície celular: o receptor da família Frizzled (FZ) e receptores da família de proteínas relacionadas a receptor LDL, conhecidos como LRP, os quais atuam como co-receptores essenciais para a interação entre Wnt e FZ. Até o presente momento, 10 receptores FZ e dois membros da família LRP, os receptores LRP-5 e 6, foram identificados em seres humanos. Os receptores FZ tem um domínio amino terminal rico no aminoácido cisteína, local em que ocorre a ligação das Wnts, sete domínios transmembranares e uma porção carboxi-terminal voltada para a face citoplasmática da membrana celular (LUSTING; BEHRENS, 2003).

As glicoproteínas Wnts ligam aos receptores de superfície celular e estimulam três vias de sinalização Wnts distintas: a via canônica, a via de polaridade planar da célula e a via Wnt/cálcio (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2004, LUSTING; BEHRENS, 2003). A via canônica, também conhecida como via clássica, ativa genes-alvo através da estabilização de  $\beta$ -catenina no citoplasma e sua translocação até o núcleo (DIHLMANN; DOEBERITZ, 2005). Na ausência de sinalização Wnt, o *pool* citosólico de  $\beta$ -catenina é continuamente degradado, como resultado da sua fosforilação pela proteína GSK-3 $\beta$  e subsequente degradação através da via ubiquitina-proteossomo (DAKENG et al., 2012).

Além da GSK-3 $\beta$ , outras proteínas fazem parte do complexo citoplasmático de destruição da  $\beta$ -catenina, como a axina, a caseína quinase -1 (CKI) e a proteína APC (do inglês: *adenomatous poliposis coli*) (DAKENG et al., 2012). Axina e APC formam uma estrutura (*scaffold*) que permite a GSK-3 $\beta$  fosforilar especificamente  $\beta$ -catenina, bem como as próprias proteínas APC e axina, sendo que a fosforilação delas é

importante para a manutenção da estabilidade do complexo de destruição (GILES; VAN ES; CLEVES, 2003).

Sobre a fosforilação de  $\beta$ -catenina, estudos têm mostrado que ela ocorre nos resíduos de aminoácidos Ser 33, 37, 45 e Thr 41 em duas etapas, como segue: o resíduo Ser 45 é primeiramente fosforilado pela CKI, a qual é seguida pela fosforilação dos outros resíduos de aminoácidos pela GSK-3 $\beta$  (AMIT et al., 2002). Após a finalização dessa etapa, a  $\beta$ -catenina é então reconhecida pela ubiquitinaligase-  $\beta$ - TrCP, induzindo a sua ubiquitinação, uma etapa inicial do processo de degradação de proteínas intracelulares pelo sistema ubiquitina-proteossomo (GILES; VAN ES; CLEVES, 2003).

Por outro lado, quando a via de sinalização Wnt é ativada, o complexo de destruição APC-Axina-GSK-3 $\beta$  é inativado, permitindo que a  $\beta$ -catenina seja translocada do citoplasma para o núcleo, mediado pela Gal-3, onde se liga aos fatores de transcrição TCF/LEF para promover a ativação da transcrição de genes alvos tais como MYC, CCND 1 e MMP7 (SHIMURA et al., 2004; DAKENG et al., 2012). Para que isso ocorra, a proteína Wnt deve se ligar ao receptor FZ na célula-alvo e promover o recrutamento da proteína Dishevelled (Dsh) próximo à membrana plasmática, onde interage com o receptor FZ, etapa essencial para inibir o complexo de destruição. Em relação aos receptores LRP, na presença de Wnts ativadoras, LRP 5 e 6 são fosforilados por GSK-3 $\beta$  e CKI, o que também promove o recrutamento de proteínas Dsh bem como a translocação da axina para a membrana plasmática e a inativação complexo de destruição (KLAUS; BIRCHMEIER, 2008). As outras duas vias, conhecidas como vias não canônicas, são menos estudadas e os seus papéis durante a tumorigênese não estão bem esclarecidos (LUSTING; BEHRENS, 2003).

Sinais inibitórios da via Wnt são modulados extracelularmente por proteínas secretadas, tais como as proteínas relacionadas com o Frizzled (FrzB), fator inibitório de Wnt-1 (WIF-1) e Cerberus Xenopus. Esses fatores se ligam a Wnt e antagonizam a sua função. Outro antagonista desta via é o Dkk (Dickkopf) que se liga ao co-receptor LRP e bloqueia sua disponibilidade (LUSTING; BEHRENS, 2003).

A via de sinalização Wnt regula vários processos fisiológicos que, quando desregulados, são importantes na promoção tumoral, como proliferação celular, angiogênese, senescência, morte celular e metástases (QIANG et al., 2005; YE et al., 2007; RAMACHANDRAN et al., 2011; ANASTAS; MOON, 2013). Além disso, a alta frequência de mutações em componentes dessa via em diferentes tipos de neoplasias

ressalta a sua importância durante o processo da carcinogênese (ANASTAS; MOON, 2013). De fato, o papel da via Wnt no desenvolvimento de tumores foi descrito pela primeira vez há trinta anos através da indução da expressão, por inserção pró-viral, de um gene até então desconhecido chamado *int-1*, promovendo a indução espontânea de hiperplasias e tumores mamários em ratas (NUSSE; VARMUS, 1982). A partir de então outros estudos evidenciaram a participação de diferentes componentes dessa via de sinalização no desenvolvimento tumoral (ANASTAS; MOON, 2013).

Dentre as mutações mais estudadas, têm-se aquelas que afetam a proteína APC, as quais foram inicialmente estudadas em pacientes portadores de polipose adenomatosa familiar, uma doença caracterizada pelo desenvolvimento de numerosos pólipos adenomatosos e um grande risco do surgimento de tumor colorretal (ANASTAS; MOON, 2013). Além do carcinoma colorretal, mutações em APC foram identificadas também em outras neoplasias, como adenomas gástricos, hepatoblastomas e carcinoma de próstata (ODA et al., 1996; LEE et al., 2002; MIYAKI et al., 1999; GERSTEIN et al., 2002).

Além disso, mutações no gene de  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*) foram identificadas em vários tipos de neoplasias humanas, incluindo tumores gastrointestinais, carcinoma endometrial, carcinoma hepatocelular, melanomas e tumores pancreáticos (MIYAKI et al., 1999; SAEGUSA et al., 2001; TAKAYASU et al., 2001; ABRAHAM, et al., 2002; CLEMENTS et al., 2002; BREUHAHN et al., 2006). Somado a essas alterações genéticas, nos últimos anos outros mecanismos de ativação da via canônica Wnt foram descobertos, tais como alterações epigenéticas que levam ao silenciamento de genes que codificam as proteínas inibidoras WIF-1 e DKK e a superexpressão de proteínas Wnts e dos receptores FZ (AQUILERA et al., 2006; CHAN et al., 2007; SATO et al., 2007; KLAUS; BIRCHMEIER, 2008; VEECK et al., 2009).

Alterações em componentes da via Wnt também já foram descritos nas neoplasias da cavidade oral. A perda de heterozigose (LOH), mutações e alterações epigenéticas de APC foram relatadas em diferentes estudos em amostras de CE de cavidade oral (LARGEY et al., 1994; MAO et al., 1998; SIKDAR et al., 2003). Em geral, os estudos mostram que as alterações no gene APC levam a uma redução na expressão da proteína APC e, por consequência, da sua atividade supressora tumoral (SAYANS et al., 2012). Com relação a isso, Gao e colaboradores (2005), avaliando 34 amostras de CE oral, encontraram LOH e hipermetilação do gene APC em 31 casos, sendo que em apenas cinco casos foi observado LOH juntamente com hipermetilação de

APC. Esse estudo ainda analisou a expressão de  $\beta$ -catenina e verificou o seu aumento nos tumores pouco ou moderadamente diferenciados, indicando que a LOH e o acúmulo de  $\beta$ -catenina parecem contribuir para a progressão maligna em CE oral (GAO et al., 2005).

A localização celular de  $\beta$ -catenina também parece ser um fator importante no desenvolvimento de CE de cavidade bucal. Isso foi demonstrado por Ishida e colaboradores (2007), que encontraram expressão nuclear de  $\beta$ -catenina em 92% dos casos de leucoplasias com displasia e em 29% das leucoplasias sem displasia. Também observaram que a expressão nuclear de  $\beta$ -catenina aumentou de maneira significativa com a severidade das displasias. Por fim, nesse mesmo estudo, os autores observaram que a expressão Wnt-3 e ciclina D1 era significativamente maior nos casos com expressão nuclear da  $\beta$ -catenina. Os autores concluíram que a ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é importante na progressão das displasias nas leucoplasias orais (ISHIDA et al., 2007).

Shiratsuchi e colaboradores (2007), analisando mutações nos genes de  $\beta$ -catenina e APC, bem como a amplificação e superexpressão de ciclina D1 e o acúmulo nuclear/citoplasmático de  $\beta$ -catenina em 44 casos de carcinoma mucoepidermóide (CME) de cabeça e pescoço, observaram que em 15,4% dos casos foram encontrados mutações em  $\beta$ -catenina e o seu acúmulo em 13,6%. Mutações em APC foram observadas apenas em dois casos de CME de baixo grau. Com relação à ciclina D1, 38,5% dos casos apresentaram amplificação do gene correspondente e 43,2% superexpressão, o que foi significativamente correlacionada com o acúmulo de  $\beta$ -catenina (SHIRATSUCHI et al., 2007).

De forma similar à proteína APC, a proteína quinase GSK-3 $\beta$ , responsável pela fosforilação de  $\beta$ -catenina, pode atuar como supressora tumoral e ter sua ação diminuída durante a transformação maligna em alguns tipos de câncer (LUO, 2009). Goto e colaboradores (2002), avaliando a expressão de GSK-3 $\beta$  e ciclina D1 em 41 casos de CE de língua, encontram superexpressão de ciclina D1 em 66% e uma expressão reduzida GSK-3 $\beta$  em 39% dos casos. Ademais, a redução dos níveis de GSK-3 $\beta$  esteve correlacionada com o aumento da expressão de ciclina D1 e menor sobrevida dos pacientes (GOTO et al., 2002).

## 2.4- As glicoproteínas Wnts

As proteínas Wnts são glicoproteínas produzidas por diferentes tipos de células. A Wnt-1 foi identificada pela primeira vez como um oncogene ativado por vírus em tumores mamários de ratas e denominada *Int-1* (NUSSE; VARMUS, 1982). Em *Drosophila* o gene homólogo é chamado *wingless* e a combinação de ambos os nomes originou o termo Wnt (LUSTING; BEHREN, 2003). Atualmente existem mais de 20 genes WNTs conhecidos. Os produtos proteicos desses genes, as glicoproteínas Wnts, apresentam em sua estrutura aproximadamente 24 resíduos do aminoácido cisteína e, em média, 350-400 aminoácidos, com peso molecular variando de 39 kDa (Wnt-7A) a 46 kDa (Wnt-10A) (LUSTING; BEHREN, 2003; ESPADA et al., 2009). A região amino-terminal dessas glicoproteínas é responsável por mediar interação com os receptores FZ, enquanto que a região carboxi-terminal é necessária para a ativação destes receptores (LUSTING; BEHREN, 2003).

Em termos funcionais, nem todas as Wnts ativam a via canônica Wnt/ $\beta$ -catenina, sendo que as principais proteínas ativadoras dessa via são Wnt-1, Wnt-3A e Wnt-8 (LUSTING; BEHRENS, 2003). Além disso, as células tumorais respondem de maneira distinta à estimulação pelos ligantes Wnts (ANASTAS; MOON, 2013). Isto foi observado em células epiteliais de mama, nas quais Wnt-7A, Wnt-3A e Wnt-1 foram associadas com transformação maligna, ao passo que as proteínas Wnt-6, Wnt-4 e Wnt-5A não apresentaram o mesmo efeito (WONG; GAVIN; MCMAHON, 1994; SHIMIZU et al., 1997). Da mesma forma, outro estudo mostrou que a superexpressão de Wnt-1 induziu hiperplasia em células de glândulas mamárias em camundongos, o que não foi observado com as proteínas Wnt-7B e Wnt-5A (NAYLOR et al., 2000).

Verras e colaboradores (2004), investigando o papel de Wnt-3A no crescimento de linhagens celulares de câncer de próstata, demonstraram que essa proteína é capaz de induzir a atividade dos receptores de andrógeno e aumentar os níveis citosólicos e nucleares de  $\beta$ -catenina. Os resultados demonstraram ainda que a Wnt-3A desempenha um papel importante na transcrição e no crescimento celular mediado por andrógenos em células prostáticas e que essa regulação parece envolver a ativação de  $\beta$ -catenina (VERRAS et al., 2004). Por outro lado, Chien e colaboradores (2009) observaram que linhagens de células de melanoma humano e de murinos cultivadas com Wnt3-A mostraram uma proliferação celular diminuída, mostrando, mais uma vez, que as

respostas às proteínas Wnts podem variar de acordo com o tipo celular (CHIEN et al., 2009).

Achados similares têm sido observado com a proteína Wnt-7A. Enquanto que em células de câncer de ovário esta glicoproteína regula a proliferação e a transcrição gênica na dependência de  $\beta$ -catenina (YOSHIOKA et al., 2012), em linhagem celular derivada de leucemia linfoblástica aguda, Wnt-7A inibe a proliferação celular e tem pouco efeito sobre os níveis citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina (HERNANDEZ et al., 2012). Uma explicação para esse comportamento distinto é que a via Wnt/ $\beta$ -catenina altera os perfis transcricionais de muitos genes diferentes num padrão tecido-específico (ANASTAS; MOON, 2013).

Em relação à proteína Wnt-1, Huang e colaboradores (2008), estudando carcinoma de pulmão, observaram que a expressão de  $\beta$ -catenina foi significativamente maior nos tumores positivos para Wnt-1. A expressão de Wnt-1 foi ainda significativamente correlacionada com a ativação dos genes MYC, CCND1 e MMP7. Além disso, houve uma correlação significativa entre a expressão da glicoproteína e prognóstico dos pacientes (HUANG et al., 2008). Rhee e colaboradores (2002), investigando a expressão de Wnt-1, Wnt-5A, Wnt-7A, Wnt10-B, Wnt-13 e dos receptores FZ2 e FZ5 em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço e compararam com células normais de epitélio oral e bronquiolar, observaram um aumento dos níveis de mRNA de Wnt-1, Wnt-7a, Wnt-10b, Wnt-13 e de FZ2, bem como das proteínas Wnt-1 e Wnt-10B nas linhagens celulares de carcinoma quando comparadas com o epitélio normal. Além disso, eles mostraram que na presença de anticorpos anti-Wnt-1 e anti-Wnt-10B houve uma redução na expressão de  $\beta$ -catenina e ciclina D1 e inibição do crescimento celular (RHEE et al., 2002).

Prado e colaboradores (2009), utilizando amostras de carcinoma de cabeça e pescoço e mucosa oral normal como controle para analisar a expressão de glicoproteínas Wnts e os receptores FZ, verificaram que, ao contrário do que observado no trabalho descrito por RHEE e colaboradores (2002), a proteína Wnt-1 não foi expressa na maioria das amostras de carcinomas. Em contraste, altos níveis de Wnt-5A, Wnt-13, Wnt-10B e Wnt-7A foram encontrados nas áreas tumorais quando comparadas ao controle, fato também observado em relação aos receptores FZ2 e FZ5. O trabalho evidenciou mais uma vez a importância desses componentes da via de sinalização Wnt em carcinoma de cabeça e pescoço (PRADO et al., 2009).

Com relação à expressão dessas glicoproteínas em modelos animais, Fracalossi e colaboradores (2010) avaliaram a expressão de Wnt-1 e Wnt-5A, bem como dos receptores FZ1 e FZ5 e de  $\beta$ -catenina em amostras de língua de camundongos submetidos ao tratamento com carcinógeno 4NQO. A expressão de Wnt-1 foi encontrada na maioria das lesões displásicas e carcinomas, contudo, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de nenhum dos marcadores entre os animais do grupo controle e os submetidos ao tratamento. Estes resultados indicam a necessidade de mais estudos para compreensão da importância dos componentes da via Wnt em modelos experimentais de carcinogênese bucal (FRACALOSSO et al., 2010).

## 2.5- Via de sinalização Hedgehog

A via de sinalização Hedgehog (Hh) é um regulador importante para a proliferação celular, diferenciação e polaridade tecidual. Os ligantes da via Hh constituem uma família de proteínas secretadas que desempenham um papel central no desenvolvimento embrionário e na renovação de células tronco em adultos (BEACHY et al., 2004). Os genes desta via foram identificados pela primeira vez por Nusslein-Volhard e Wieschaus (1980) como responsáveis por controlar o padrão de segmentação em *Drosophila melanogaster* (NUSSLEIN-VOLHARD; WIESCHAUS, 1980).

Nos mamíferos, três ligantes homólogos foram identificados: Sonic (Shh), Indian (Ihh) e Desert (Dhh). O Shh é o ligante mais comumente expresso e melhor caracterizado, sintetizado como uma proteína precursora de 45 kDa que, após sofrer clivagem, é covalentemente modificada até adquirir a sua forma biologicamente ativa (TANG et al., 2007; MIMÉAULT; BATRA, 2010). Em geral, as proteínas da via Hh ativam um complexo receptor de membrana formado pelos receptores Patched (Ptch1 e Ptch2) e Smoothened (Smo). O receptor Ptch é o inibidor chave da sinalização Hh devido a sua atividade inibitória sob Smo, uma proteína reguladora positiva da via Hh e responsável pela ativação de fatores de transcrição (XUAN et al., 2006; TANG et al., 2007).

O mecanismo pelo qual Ptch inibe a função de Smo e o processo pelo qual os ligantes Hh bloqueiam essa inibição ainda não são conhecidos. Contudo, não parece haver uma ligação direta entre Ptch e Smo (TAIPALE et al., 2002). Tem sido proposto que Ptch transporte pequenas moléculas inibidoras de Smo, baseado na semelhança de Ptch com proteases bacterianas capazes de transportar pequenas moléculas hidrofóbicas

(TAIPALE et al., 2002). O transporte destes inibidores seria então bloqueado na presença de ligantes Hh. Embora tal teoria não tenha sido claramente elucidada, foi demonstrado que Shh afeta a localização subcelular de Ptch, diminuindo a quantidade deste receptor na membrana plasmática, mediado pela sua internalização em vesículas endocíticas (CHEN et al., 2002; OGDEN et al., 2004; TANG et al., 2007).

Nas células em que não há ligação de Shh ao receptor Ptch, Smo se localiza em pequenas vesículas endossomais, onde provavelmente ocorre a sua degradação. Contudo, quando há ativação dessa via, a proteína Smo se move para a membrana plasmática para, de fato, deflagrar a via Hh, mediando à ativação de fatores de transcrição (OGDEN et al., 2004). Os fatores de transcrição ativados por Smo pertencem à família de fatores de transcrição associados ao glioma (Gli). Uma vez ativada a via Hh, a fosforilação de Smo o torna ativo e capaz de interagir com a proteína SuFu (do inglês: *supressor of fused*), um regulador negativo que se liga a proteína Gli, inibindo-a (KOGERMAN et al., 1999; TANG et al., 2007).

A respeito da proteína Gli, o seu gene está localizado no locus 12q13.3 e codifica uma proteína de 118kDa com cinco domínios de ligação ao DNA (KINZLER et al., 1988). Existem três proteínas nesta família conhecidas como Gli-1, Gli-2 e Gli-3, as quais se comportam de modo distinto nos mamíferos. Gli-1 é conhecido por funcionar como um oncogene em tumores, enquanto que Gli-2 e Gli-3 podem atuar como oncogenes ou supressores tumorais, dependendo do contexto celular (XUAN et al., 2006). Como fatores de transcrição, as moléculas Gli podem regular a expressão de genes alvo por associação direta com sítios de ligação 5'-tggtgtggtc-3' localizados na região promotora de genes específicos, como BCL2, CCND1 e CCND2, os quais estão envolvidos na sobrevivência e regulação do ciclo celular (TANG et al., 2007).

Alguns estudos têm demonstrado a existência de uma relação entre as vias de sinalização Hh e Wnt. Neste sentido, verificou-se que a ativação de Gli estimula a transcrição gênica de ligantes da via Wnt (COHEN, 2003). Além disso, Mizuarai e colaboradores (2009) propuseram que GSK-3 $\beta$  atua na fosforilação e inativação dos fatores de transcrição da família Gli, uma vez que a inibição da via PIK3 em linhagens celulares de câncer de pulmão reduziu as formas fosforiladas de GSK-3 $\beta$ , seguida por degradação de Gli-1 (MIZUARAI et al., 2009). Além disso, recentemente foi mostrado que a presença da via de sinalização Hh ativa estava diretamente relacionada com o aumento da forma inativa da GSK-3 $\beta$  em pele de camundongos, o que pareceu ser induzido pela presença de Gli-3. Ainda nesse estudo, os autores observaram que, em



folículos pilosos de camundongos KO para o gene Hh que expressavam altos níveis de GSK-3 $\beta$  inativa, também apresentaram altos níveis de  $\beta$ -catenina, sugerindo uma comunicação cruzada entre as vias de sinalização Wnt e Hh mediada pela GSK-3 $\beta$  (MILL et al. 2005). Outro estudo propôs ainda que Gli-3 pode sofrer um processo de clivagem proteolítica que gera uma forma repressora da transcrição gênica, e este processo parece ser mediado pela sua fosforilação mediada pela GSK-3 $\beta$  (KISE et al., 2009).

Em relação ao papel dessa via no contexto tumoral, a sua importância tornou-se evidente pela primeira vez em pacientes com a síndrome Gorlin-Goltz, a qual é caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplos carcinomas basocelulares, cuja causa primária, nesses casos, é a presença de mutação do gene Ptch1 (THEUNISSEN; SAUVAGE, 2009). Além do carcinoma basocelular, alterações de componentes dessa via de sinalização já foram descritos em vários tipos de neoplasias humanas, tais como carcinomas de cólon, pâncreas, gástrico, mama, pulmão, próstata, útero, ovário, hepatocelular e em linfomas (BERMAN et al, 2003; TAYER et al., 2003; WATKINS et al., 2003; KARHADKAR et al., 2004; SANCHES et al., 2004; OHTA et al., 2005; XUAN et al., 2006; BIAN et al., 2007; TANIGUCHI et al., 2007; HEDGE et al., 2008; BHATTACHARYA et al., 2008; TADA et al., 2008; XUAN; LIN, 2008).

Com relação a neoplasias da cavidade oral, Buim e colaboradores (2011) analisaram a expressão Shh, Smo, Ptch e Gli-1 em amostras de CE e em amostras de mucosa oral não neoplásica e observaram que não houve expressão dos genes avaliados em nenhuma das amostras de mucosa oral normal. Por outro lado, todos os casos de carcinoma expressaram níveis elevados de Ptch-1, Smo e Gli-1, sendo que a expressão de Smo esteve associada ao estágio clínico e metástase para linfonodo cervical, sugerindo o papel importante dessa via na tumorigênese desse tipo de neoplasia (BUIM et al., 2011). De forma similar, Wang e colaboradores (2012), avaliando a expressão de Ptch, Shh e Gli-1 em amostras de pacientes com CE de cavidade bucal, observaram um aumento da expressão de Ptch nos casos metastáticos e a superexpressão nuclear de Gli-1 foi correlacionada com tamanho do tumor primário, metástase linfática e recidiva (WANG et al., 2012).

Até o presente momento, não há estudos avaliando a expressão de proteínas dessa via em modelos animais de carcinogênese bucal, em especial em animais KO par Gal-3, como também uma associação entre a via Hh e Wnt nesse contexto.

Recentemente, um estudo realizado em nosso laboratório mostrou que a expressão de GSK-3 $\beta$  inativa estava associada com transformação maligna de epitélio lingual de camundongos WT, mas não de camundongos KO para Gal-3 (MENDONÇA et al. 2012). Diante desses dados preliminares, é plausível supor que nos animais WT haja uma maior ativação da via de sinalização Hh, uma vez que nesses animais essa proteína está predominantemente na forma inativa (MENDONÇA et al. 2012). Além disso, considerando que em outro trabalho utilizando esse mesmo modelo nenhuma diferença na expressão de  $\beta$ -catenina não membranosa foi encontrada nos dois grupos de camundongos (SANTANA et al., 2011), nossa hipótese foi de que não haveria diferença de expressão das proteínas Wnt-1 e Wnt-3A nos dois grupos camundongos, indicando que a via de sinalização Wnt está, de fato, ativa em ambos os grupos.

### **3-OBJETIVOS**

Avaliar a expressão de proteínas ativadoras da via de sinalização Wnt, Wnt-1 e Wnt-3A, bem como de proteínas da via de sinalização Hh, Gli-3 e Shh, num modelo de carcinogênese bucal induzida em camundongos KO para Gal-3 usando como controle animais WT.

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

Todo o protocolo de experimentação animal empregado no estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU) com o número de protocolo 038/09 (ANEXO D).

Para estudo da expressão das proteínas Wnt-3A, Wnt-1, Shh e Gli-3 foram usadas amostras de língua já emblocadas em parafina oriundas de camundongos *wild-type* (WT) e *knockout* (KO) para Gal-3 desafiados com o carcinógeno 4NQO, cujo modelo experimental foi desenvolvido durante o doutoramento do Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria, o qual é resumidamente apresentado a seguir.

### 4.1-Grupos de Estudo

Para desenvolvimento do modelo experimental, dois grupos de estudo foram empregados, como segue: 1) o Grupo KO, representado por camundongos KO para o gene da Gal-3, os quais foram gerados conforme descrito por Hsu et al (2000), e 2) o Grupo WT, compreendendo camundongos WT da linhagem C57BL/6. Cada Grupo foi subdividido em cinco subgrupos correspondentes aos períodos de observação da carcinogênese, a saber: 16, 20, 24, 28, 32 semanas. Todos os animais inicialmente empregados no estudo tinham de seis a oito semanas de idade e pesavam entre 21-23g. Além disso, durante todo o experimento, os camundongos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno forradas com serragem e mantidos em temperatura constante de 22°C com ciclo claro/escuro de 12 h. Todos os animais receberam ração apropriada para camundongo e água filtrada diluída com carcinógeno por 16 semanas e somente água filtrada após esse período até o tempo de permanência de sacrifício.

#### 4.1.1-Protocolo de Preparação e de Aplicação do 4NQO

O protocolo de preparação e tratamento com 4NQO seguiu os critérios estabelecidos por Tang et al. (2004), com algumas modificações. O carcinógeno 4NQO foi sempre diluído apenas em água filtrada até atingir a concentração final de 100 µg/ml. Ambas as soluções foram preparadas semanalmente, dispensadas em frascos (mamadeiras) de polivinil e de vidros e oferecidos *ad libitum* por até 16 semanas.

#### **4.1.2-Sacrifício dos animais, dissecação da língua e obtenção dos preparados histológicos**

Com exceção dos animais dos subgrupos WT e KO de 16 semanas, os quais foram sacrificados imediatamente depois de completado o tempo máximo de tratamento (16 semanas), os demais foram sacrificados consecutivamente a cada quatro semanas até a semana 32. O sacrifício obedeceu ao protocolo de sedação com inalação de éter e, em seguida, após perda de consciência, deslocamento cervical. Imediatamente após o sacrifício, retirou-se de cada camundongo o monobloco língua+esôfago por meio de incisão na face ventral do animal, o qual se estendeu do esterno à região submandibular. Todas as amostras teciduais foram imediatamente colocadas em frascos contendo solução de formalina a 4% e fixados por, no mínimo, 24 h. Após esse período, os fragmentos de língua foram submetidos ao processamento rotineiro para exame histopatológico, obedecendo ao protocolo sucintamente descrito a seguir: desidratação, diafanização, inclusão em parafina e recorte de secções histológicas de 5 µm de espessura, após o qual foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) para análise microscópica para estudo da carcinogênese bucal.

#### **4.1.3-Análise microscópica para detecção de displasia e carcinoma**

Para reconhecimento e classificação histológica das displasias para estudo da carcinogênese e também para estudo da expressão imunoistoquímica das proteínas investigadas, utilizou-se critérios estabelecidos por Lumerman et al. (1995). Para isso, as seguintes alterações no tecido epitelial para diagnóstico das displasias foram empregadas, como segue: hiperplasia de células basais, perda da estratificação normal, pleomorfismo celular, anisocitose e anisonucleose, hipercromatismo nuclear, perda da polarização e de adesão de queratinócitos (acantólise), mitoses acima da camada basal, queratinização individual de células, cones epiteliais “em gota”, queratinização de superfície (paraqueratinizado, hiperqueratose, verrucosa e papilar). Contudo, para reconhecimento de uma área displásica em tecido epitelial, um critério mínimo foi usado, ou seja, presença de hiperplasia de camada basal, hipercromatismo e aumento do tamanho nuclear e projeção epitelial “em gota”.

Identificada à área, cada lesão displásica foi categorizada como leve, moderada e grave segundo a localização das alterações na espessura do epitélio, como segue: presença de alterações somente no terço basal para displasia leve, presença de alterações comprometendo o terço basal e médio para displasia moderada, e presença de alterações envolvendo o terço basal, médio e superior para displasia grave. Todos os carcinomas in situ foram classificados como carcinomas (TABELA 1).

**TABELA 1 – Critério de classificação das displasias de acordo com o grau histológico, como descrito por Lumerman et al (1995).**

<b>Classificação Histológica das Displasias</b>	<b>Descrição</b>
Displasia leve	Alterações mínimas confinadas no terço inferior do epitélio
Displasia moderada	Alterações comprometendo até $\frac{2}{3}$ do tecido epitelial
Displasia grave	Alterações comprometendo $>\frac{2}{3}$ sem envolver todo o epitélio.

Cada CE foi classificado segundo os critérios estabelecidos pela OMS 2005 (Barnes et al., 2005), os quais se fundamentam no grau de diferenciação escamosa frequentemente identificadas como graus variáveis de formação de pérolas de queratina e, por fim, crescimento invasivo (TABELA 2).

**TABELA 2 - Classificação histológica dos CE baseada em critérios de diferenciação tecidual neoplásica recomendado pela Organização Mundial da Saúde, 2005.**

<b>Classificação Histológica dos Carcinomas Epidermóides</b>	<b>Descrição</b>
Bem Diferenciado	Neoplasia que apresenta características semelhantes ao tecido epitelial normal, mínima atividade mitótica e grande queratinização.
Moderadamente Diferenciado	Neoplasia que apresenta pleomorfismo nuclear e atividade mitótica e, normalmente, pouca queratinização.
Pobrememente Diferenciado	Neoplasia com predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típica e atípica e reduzida queratinização.

Em relação à evolução da carcinogênese lingual nos dois grupos de camundongos estudados, os resultados foram recentemente publicados (FARIA et al. 2011). Em resumo, em ambos os grupos, observou-se uma redução do número de camundongos com displasia da semana 16 para semana 32 e um aumento progressivo de animais diagnosticados com carcinomas. Embora tenha sido observada uma maior incidência de camundongos WT com carcinoma ao final do período experimental (100% acometimento) quando comparado com camundongos KO (83,3% dos animais), essa diferença não foi estatisticamente significativa. Na análise do número de tumores/camundongo, notou-se que 35,7% dos camundongos WT tiveram mais de três tumores na língua, em detrimento de apenas 18,1% dos camundongos KO. Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa, sugerindo que a ausência de Gal-3 parece não influenciar no desenvolvimento experimental de tumores em língua de camundongos desafiados com o carcinógeno 4NQO.

#### 4.2 – Imunoistoquímica

Para estudo imunoistoquímico, empregou-se a técnica estreptavidina-biotina-peroxidase. Dados sobre a origem dos anticorpos policlonais e as titulações empregadas para cada um deles podem ser vistos na Tabela 3.

**TABELA 3- Anticorpos utilizados e suas respectivas concentrações.**

<b>Especificidade</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Número de catálogo</b>	<b>Título/Diluição</b>
<b>WNT-1</b>	Santa Cruz <sup>1</sup>	6280	1:200
<b>WNT-3A</b>	Millipore <sup>2</sup>	09-162	1:200
<b>GLI-3</b>	Santa Cruz <sup>1</sup>	20688	1:50
<b>SHH</b>	Santa Cruz <sup>1</sup>	9024	1:100

1- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA.

2- Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA.

Para realização da técnica, cortes de 3µm de espessura foram feitos e montados em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropiltriexilano (Sigma, St. Louis, MO, USA). Em seguida, os cortes teciduais foram desparafinados em xilol e reidratados em soluções decrescentes de etanol. Para retirada do pigmento formólico, todas as amostras foram submetidas a um banho de 15 min em solução de hidróxido de amônio a 10% e etanol a 95% e então, lavados em água corrente por 5 min.

Para a recuperação dos epítomos antigênicos, utilizou-se solução de EDTA (1mM, pH 8.0) acrescido de 0,5 ml de Tween-20, submetendo-os a três ciclos de 15 min cada, em forno de microondas à potência máxima. Após resfriamento e lavagem em água destilada, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 10V, mediante três banhos de 5 min cada, seguidos de lavagem em solução tampão TRIS-HCL (pH7,4). Na etapa seguinte, os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos em solução tampão de TRIS-HCL nas titulações mencionadas na Tabela 3 por 18 h, a 4°C. Após nova lavagem em TRIS-HCL, procedeu-se a amplificação da reação com o sistema estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 30 min, à temperatura ambiente, em solução com o anticorpo secundário biotinilado. Em seguida, os cortes foram novamente lavados em solução TRIS-HCL para nova incubação por 30 min, à temperatura ambiente, em solução de estreptavidina conjugada à peroxidase. Finalmente, os cortes foram lavados em solução de TRIS-HCL e a reação revelada com o cromógeno 3.3' tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (Dako, Co, Carpinteria, CA, USA) e peróxido de hidrogênio por 3 min. Todos os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris. Como controle positivo das reações, foram utilizadas amostras de testículo de rato para Gli-3, estômago de camundongo para Shh e carcinoma de mama humano para Wnt-3A e Wnt-1. A omissão do anticorpo primário foi usada como controle negativo em cada ensaio.

#### 4.3- Análise da imunoistoquímica

Para análise da expressão das proteínas Wnt-1, Wnt-3A, Shh e Gli-3, empregou-se método proposto por Sinacope et al. (1995). Trata-se de um método semiquantitativo baseado na intensidade e porcentagem de células marcadas, conforme o Quadro 1.

**QUADRO 1- Parâmetros para avaliação da imunoistoquímica nas displasias e carcinomas.**

<b>Intensidade</b>	<b>Escore</b>	<b>Porcentagem de células marcadas</b>	<b>Escore</b>
<b>Fraca</b>	1	< 5%	0
		5- 25%	1
<b>Moderada</b>	2	26-50%	2
		51-75%	3



<b>Forte</b>	3	> de 75%	4
--------------	---	----------	---

Todas as análises imunoistoquímicas foram feitas usando um microscópio óptico (Leica Co, modelo DM 500) num aumento de 400x. Devido ao pequeno tamanho das lesões, todos os possíveis campos obtidos de cada lesão foram analisados. Inicialmente, estabeleceu-se um escore inicial para cada campo analisado multiplicando os valores obtidos de intensidade e porcentagem de células marcadas, e, em seguida, um escore médio final para cada lesão (ANEXO A). Todos os dados foram tabulados em uma planilha do Excel (Microsoft, 2007).

#### **4.4- Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism versão 6.00 (GraphPad Software, San Diego, USA). Para definição de qual teste estatístico a ser empregado em cada análise, utilizou-se o teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Assim, para a análise intragrupo e intergrupo, ou seja, comparando a expressão de cada uma das proteínas investigadas entre as displasias leve, moderada, grave e carcinomas de cada grupo ou entre os grupos WT e KO, utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Em seguida, na presença de uma diferença estatisticamente significativa, aplicou-se o pós-teste de Dunn de múltiplas comparações para identificação das diferenças. Para investigar o papel dessas proteínas na transformação maligna do epitélio lingual, a expressão de cada proteína foi analisada entre as displasias (como um grupo) e carcinomas de cada grupo em separado, aplicando-se o teste U Mann-Whitney. Em todas as análises, foi considerado estatisticamente significativo quando  $p < 0,05$ .

## 5-RESULTADOS

No total foram analisados 37 camundongos no grupo WT e 38 do grupo KO. Para cada caso, procurou-se avaliar a expressão das proteínas em todas as lesões displásicas e carcinomas presentes nos fragmentos teciduais analisados para cada animal. Contudo, pelo fato de que as lesões eram relativamente pequenas, algumas delas se perderam durante o recorte e aprofundamento dos blocos, o que fez com que o número de lesões avaliadas não fosse exatamente o mesmo para cada anticorpo empregado no estudo, como pode ser visto na Tabela 4.

**TABELA 4- Número de lesões analisadas para cada anticorpo tanto no grupo WT quanto no KO.**

Tipo de Lesão	Anticorpos			
	WNT1	WNT3A	SHH	GLI3
	n WT/KO	n WT/KO	n WT/KO	n WT/KO
<b>Displasia leve</b>	40/46	36/47	40/46	41/49
<b>Displasia moderada</b>	58/90	67/95	74/90	79/99
<b>Displasia grave</b>	26/38	32/42	28/35	37/43
<b>Carcinoma</b>	16/24	15/24	17/27	17/23

n: número de lesões

### 5.1 - Expressão das proteínas Wnt-1 e Wnt-3A

A expressão da proteína Wnt-1 foi negativa tanto nas displasias quanto nos carcinomas oriundos dos grupos WT e KO. Por outro lado, a imunoreatividade para a proteína Wnt-3A foi observada em 80% e 69,5% das displasias, e em 73,3% e 66,7% dos carcinomas nos grupos WT e KO, respectivamente. No geral, a imunomarcagem da proteína Wnt-3A variou de fraca a forte, sendo observada no núcleo, citoplasma e membrana plasmática das células displásicas e neoplásicas (FIGURA 1)

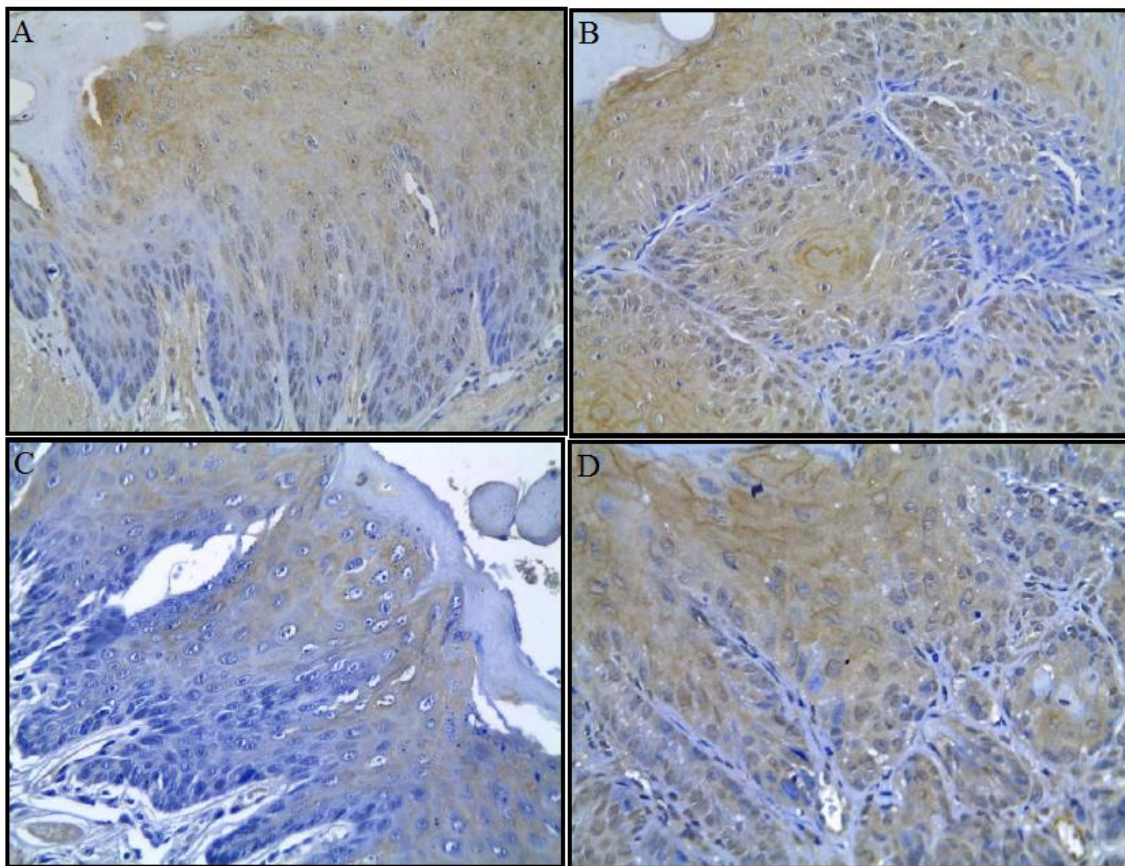


FIGURA 1- Expressão imunoistoquímica de Wnt-3A. A: Animal WT, displasia moderada, na qual se observa moderada marcação nuclear e citoplasmática; B: Animal WT, carcinoma, com moderada marcação nuclear e citoplasmática; C: Animal KO, displasia leve, na qual se observa fraca marcação citoplasmática predominante nas células não alteradas; D: Animal KO, carcinoma, no qual se observa moderada marcação nuclear e citoplasmática (aumento original de 400X).

Os dados numéricos das médias, medianas, máximo e mínimo de cada lesão/grupo para essa proteína nos dois grupos podem ser vistos no ANEXO B. No geral, a média de positividade para Wnt3-A nas displasias e carcinomas do Grupo WT foi sempre maior quando comparado com o grupo KO (WT: 5,07 e 5,02; KO: 3,25 e 4,07, respectivamente). Comparando a expressão de Wnt-3A na evolução das displasias para os carcinomas, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa nos dois grupos (FIGURA 2)

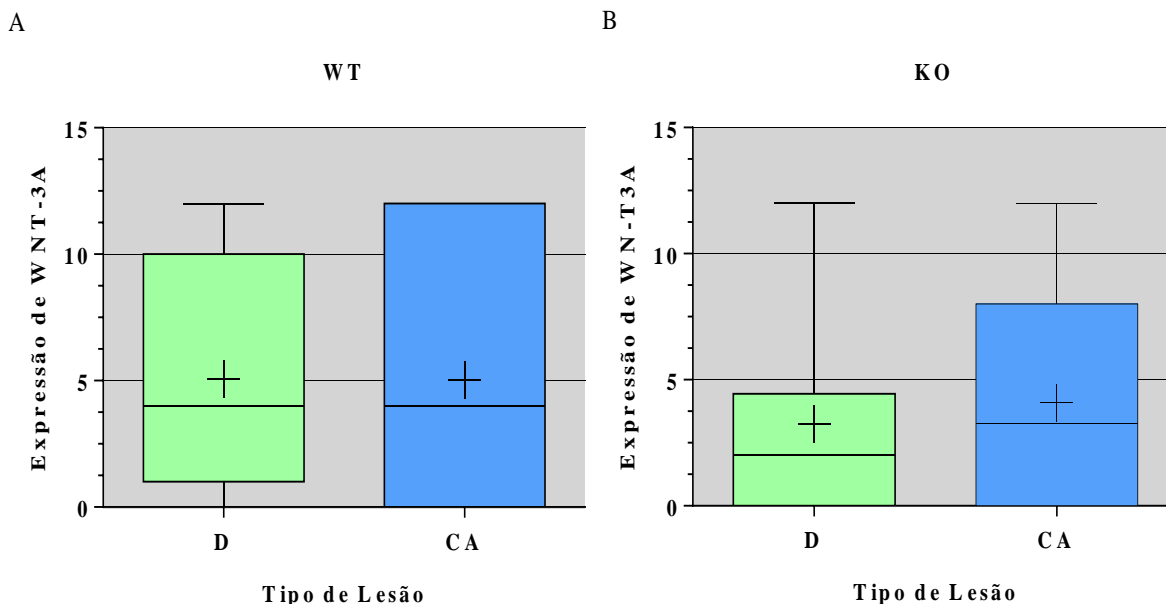


FIGURA 2- A: Expressão de Wnt-3A no grupo WT (teste U de Mann- Whitney,  $p=0,9788$ ); B: Expressão de Wnt-3A no grupo KO (teste de Mann- Whitney,  $p=0,3646$ ); D: Displasia; CA: Carcinoma; (+): média.

Na análise intragrupo, ou seja, comparando simultaneamente a expressão dessa proteína entre as displasias leve, moderada, grave, carcinomas, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nos dois grupos estudados (FIGURA 3). Na análise intergrupo, ou seja, comparando simultaneamente a expressão dessa proteína nas lesões displásicas e carcinomas entre os grupos WT e KO, uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada ( $p=0,043$ ). Contudo, o pós-teste de Dunn para múltiplas comparações não identificou nenhuma diferença nos cruzamentos realizados, sugerindo que, na verdade, essa diferença provavelmente não exista. Esses achados podem ser vistos na Figura 4 e no ANEXO C.

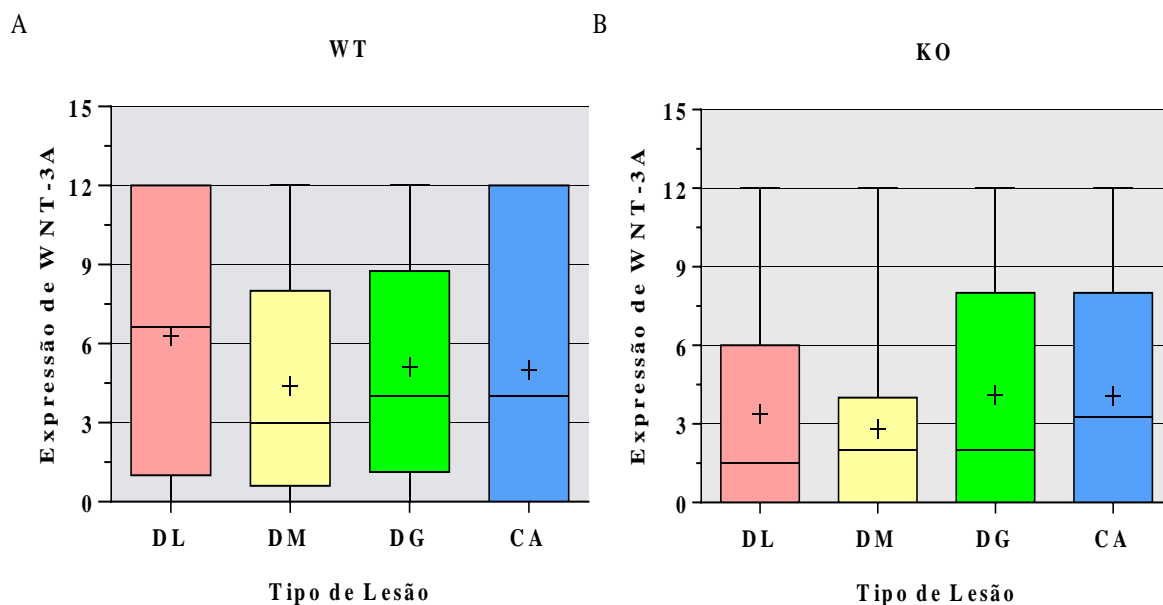


FIGURA 3- A: Expressão de Wnt-3A no grupo WT (teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,3719$ ); B: Expressão de Wnt-3A no grupo KO (teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,6772$ ); DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma. (+): média.

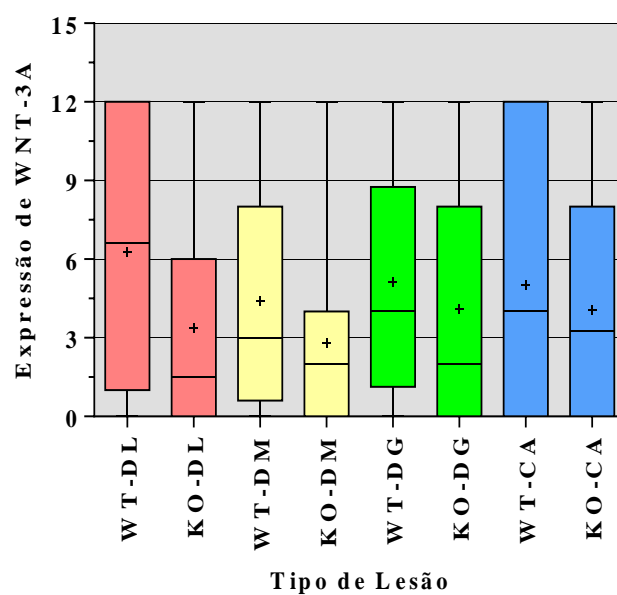


FIGURA 4-Análise comparativa da expressão de Wnt-3A entre os grupos WT e KO (Teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,04$ ); DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma; (+): média.

## 5.2- Expressão das proteínas Shh e Gli-3

A imunoreatividade para a proteína Shh foi observada em 96,4% e 54,3% das displasias, e em 100% e 40,7% dos carcinomas do grupo WT e KO, respectivamente. Similar à proteína Wnt3-A, a intensidade de expressão foi variável, indo de fraca a forte. Além disso, pôde-se notar que a marcação foi predominantemente citoplasmática na grande maioria das lesões, com algumas delas apresentando marcação nuclear e, raramente, de membrana plasmática (FIGURA 5)

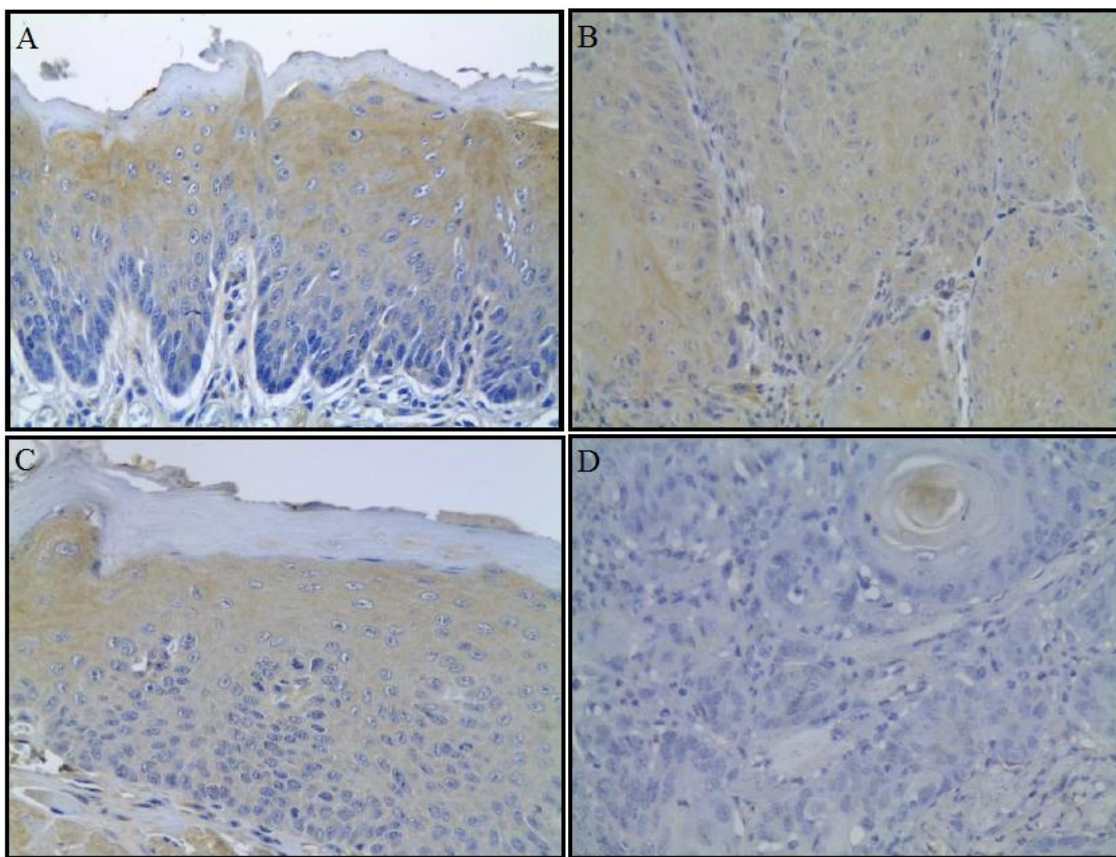


FIGURA 5- Expressão imunoistoquímica de Shh. A: Animal WT, displasia leve, na qual se observa marcação citoplasmática moderada; B: Animal WT, carcinoma, com moderada marcação citoplasmática; C: Animal KO, displasia leve, na qual se observa fraca marcação citoplasmática; D: Animal KO, carcinoma, mostrando ausência de marcação (aumento original de 400X).



Os dados numéricos das médias, medianas, máximo e mínimo de cada lesão/grupo para essa proteína nos dois grupos podem ser vistos no ANEXO B. A média de positividade para Shh nas displasias e carcinomas do grupo WT foi sempre maior quando comparado com o grupo KO (WT: 3,41 e 4,55; KO: 1,17 e 1,25, respectivamente), mesmo entre os diferentes graus de displasia. Interessante que, comparando a expressão de Shh na evolução das displasias para carcinomas em cada grupo, encontrou-se um aumento significativo na expressão dessa proteína no grupo WT ( $p=0,0037$ ), mas não no grupo KO ( $p=0,7419$ ), indicando que essa proteína está relacionada com a transformação maligna de epitélio língua em camundongos WT (FIGURA 6).

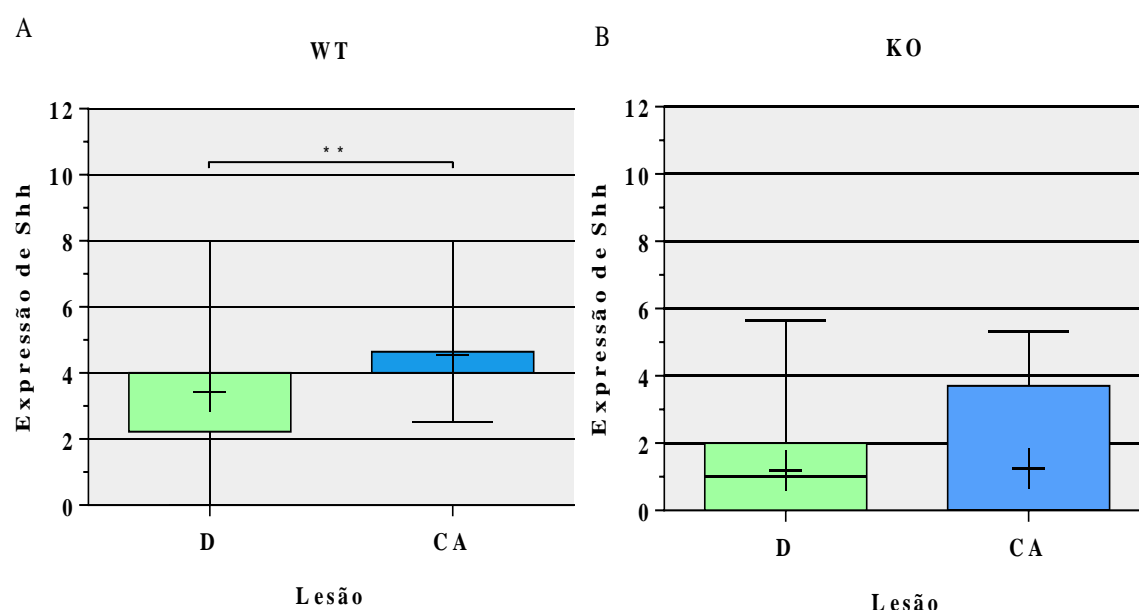


FIGURA 6-A: Expressão de Shh no grupo WT (teste U de Mann- Whitney,  $p= 0,0037$ ); B: Expressão de Shh no grupo KO (teste de Mann- Whitney,  $p= 0,7419$ ); D: Displasia; CA: Carcinoma; (+): média.

Na análise intragrupo, ou seja, comparando simultaneamente a expressão de Shh entre displasias leve, moderada, grave e carcinomas, observou-se um aumento significativo na expressão de Shh no grupo WT, fato não observado no grupo KO. Aplicando o pós-teste de Dunn para múltiplas comparações, demonstrou-se que essa significância ocorreu entre displasia leve e carcinoma, e entre displasia moderada e carcinoma. Esses resultados podem ser vistos na Figura 7 e no ANEXO C.

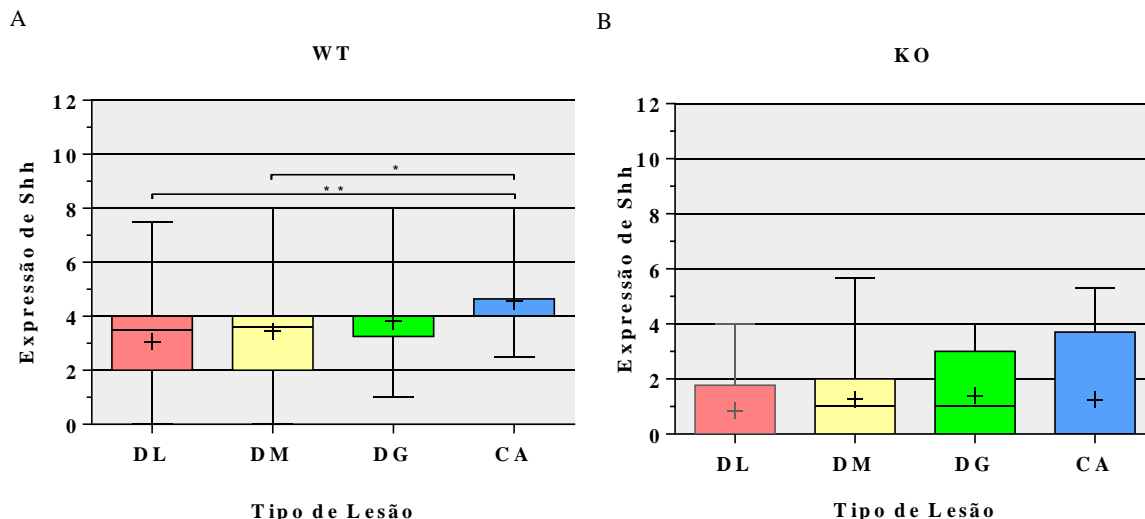


FIGURA 7- A: Expressão de Shh no grupo WT (teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,001$ ); B: Expressão de Shh no grupo KO (teste de Kruskal-Wallis,  $p=0,33$ ); DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma; (+): média.

Na análise intergrupo, ou seja, comparando simultaneamente a expressão dessa proteína nas lesões displásicas e carcinomas, encontrou-se uma diferença altamente significativa entre os grupos WT e KO ( $p<0,0001$ ), com o pós-teste de Dunn para múltiplas comparações revelando que essa diferença ocorreu em todos os cruzamentos envolvendo os grupos WT e KO (FIGURA 8).

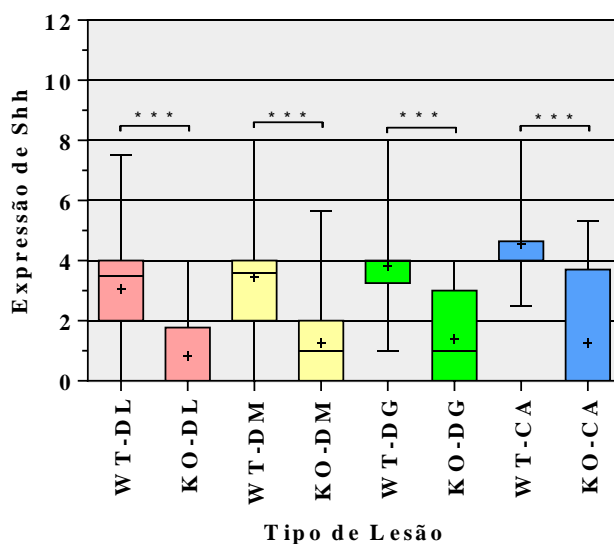


FIGURA 8- Análise comparativa da expressão de Shh entre os grupos WT e KO (teste de Kruskal-Wallis,  $p<0,0001$ ). DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma; (+): média.

A imunoreatividade para a proteína Gl-i3 foi observada em 93,6% e em 84,3% das displasias, e em 64,7% e 73,9% dos carcinomas do grupo WT e KO, respectivamente. Similar as outras proteínas, a intensidade de expressão foi variável,



indo de fraca a forte. Além disso, como notado para a proteína Shh, pôde-se notar que a marcação foi predominantemente citoplasmática, com algumas delas apresentando marcação nuclear e, raramente, de membrana plasmática (FIGURA 9).

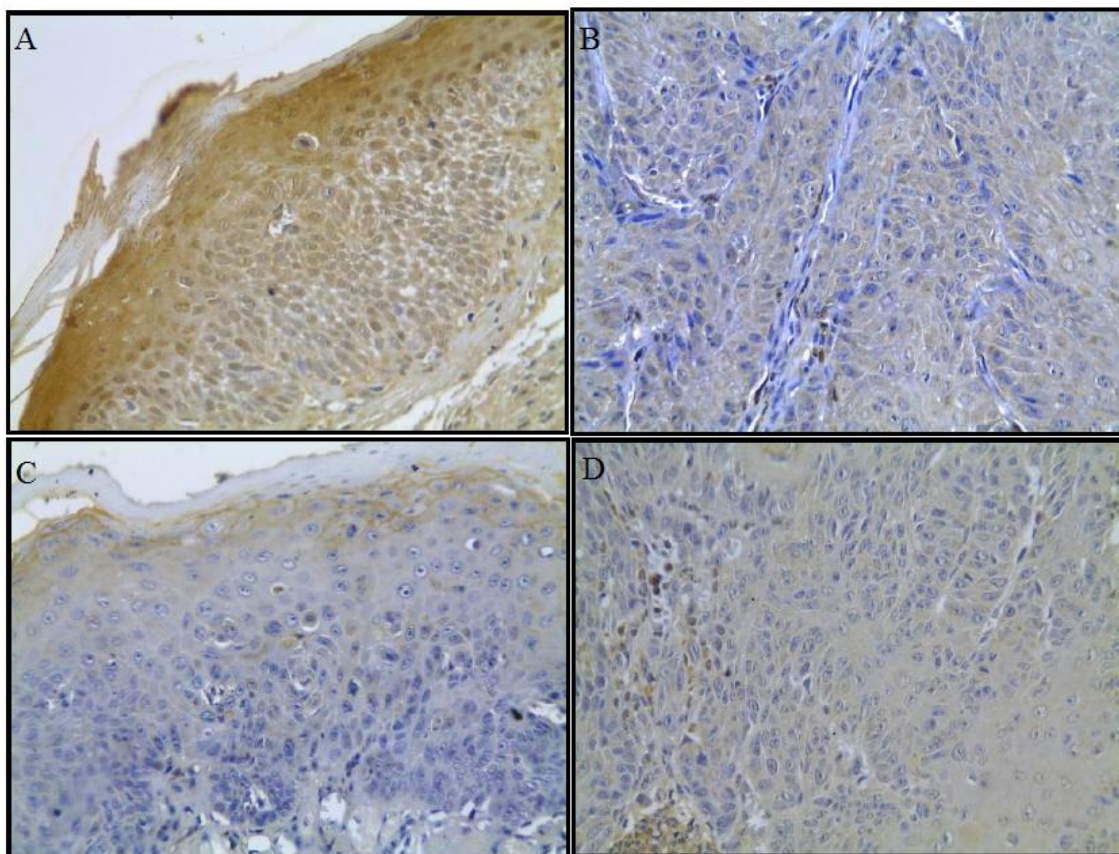


FIGURA 9- Expressão imunoistoquímica de Gli-3. A: Animal WT, displasia grave, na qual se observa intensa marcação citoplasmática e nuclear; B: Animal WT, carcinoma, com moderada marcação citoplasmática; C: Animal KO, displasia moderada, na qual se observa marcação da membrana plasmática das células mais superficiais do epitélio; D: Animal KO, carcinoma, na qual se observa fraca marcação citoplasmática (aumento de 400X).

Os dados numéricos das médias, medianas, máximo e mínimo de cada lesão/grupo para essa proteína nos dois grupos podem ser vistos no ANEXO B. Em geral, a média de positividade para Gli-3 tendeu a apresentar uma redução gradual e continua da displasia leve para carcinoma no grupo WT, enquanto que no grupo KO um discreto aumento foi observado (WT: 4,18 e 3,54; KO: 3,66 e 3,7, respectivamente). Comparando a expressão de Gli-3 na evolução da displasia para carcinoma no Grupo WT, observou-se uma diferença marginalmente significativa ( $p=0,05$ ), enquanto que no Grupo KO nenhuma diferença foi encontrada ( $p=0,97$ ). Na análise intragrupo e

intergrupo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos dois grupos (FIGURA 10 e FIGURA 11).

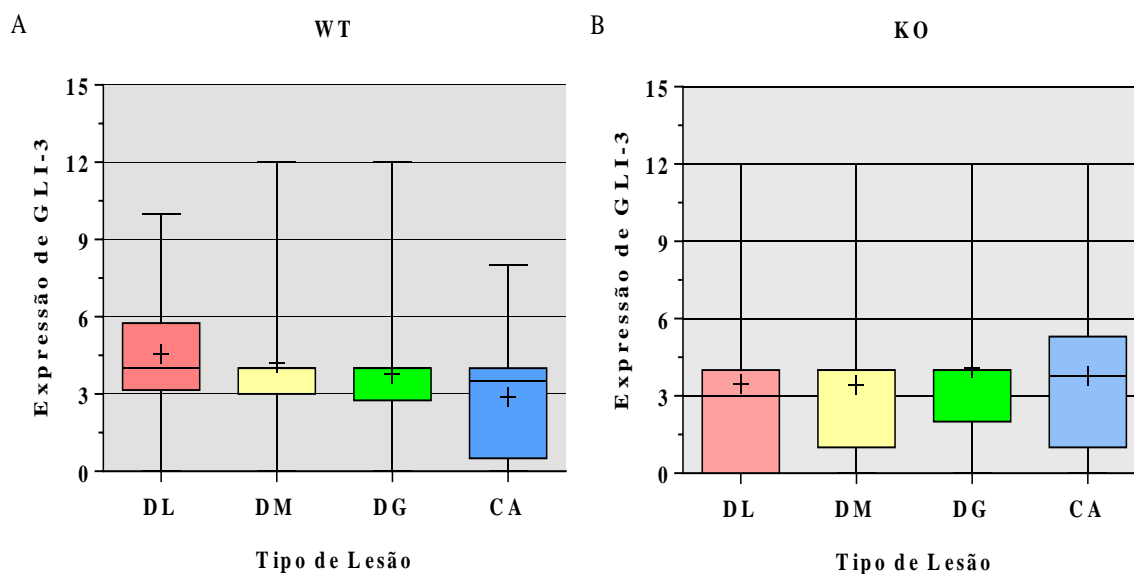


FIGURA 10- A: Expressão de Gli-3 no grupo WT (teste de Kruskal-Wallis,  $p = 0,27$ ); B: Expressão de Gli-3 no grupo KO (teste de Kruskal-Wallis,  $p = 0,49$ ); DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma; (+): média.

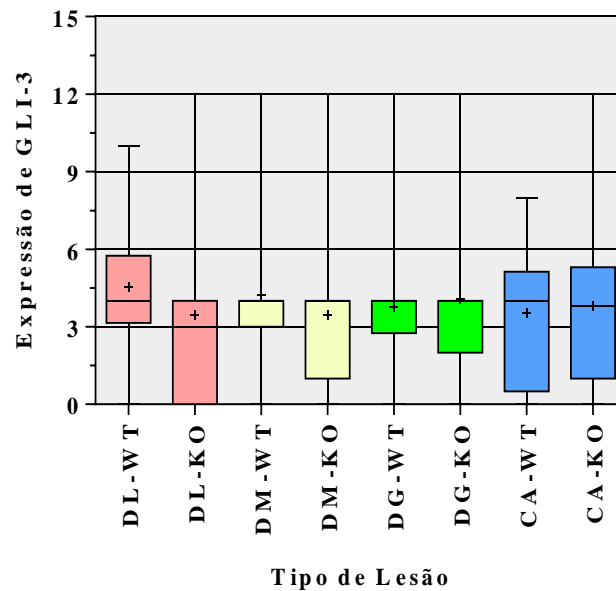


FIGURA 11-Análise comparativa da expressão de Gli-3 entre os grupos WT e KO (teste de Kruskal-Wallis); DL: Displasia Leve; DM: Displasia Moderada; DG: Displasia Grave; CA: Carcinoma; (+): média.

## 6- DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo mostraram que a expressão da proteína Shh foi significativamente maior nas displasias e carcinomas do grupo WT quando comparado com o grupo KO. Outro dado interessante foi que no processo de transformação maligna, ou seja, na evolução da displasia para carcinoma, a expressão da proteína Shh aumentou significativamente apenas no grupo WT. Além disso, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada em relação à expressão da proteína Wnt-3A entre os grupos WT e KO, bem como na evolução da displasia para carcinoma, sugerindo que, em ambos os grupos, a via de sinalização Wnt está ativa. Essa conclusão confirma um dado encontrado em um trabalho desenvolvido em nosso laboratório e recentemente publicado, o qual revelou que a expressão da proteína  $\beta$ -catenina não membranosa, considerada uma importante marcadora de ativação dessa via de sinalização, foi detectada nas displasias e carcinomas de ambos os grupos, embora a média de expressão no grupo WT tivesse sido maior (SANT'ANA et al., 2011).

A relação da Gal-3 com a via de sinalização intracelular Wnt/ $\beta$ -catenina, conhecida como via canônica, foi descrita pela primeira vez por Shimura e colaboradores (2004). Nesse estudo, os autores mostraram um papel regulador chave para Gal-3 nessa via de sinalização, seja proporcionando a translocação de  $\beta$ -catenina do citoplasma para o núcleo, seja por meio da regulação da fosforilação de GSK-3 $\beta$ , uma proteína que controla os níveis citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina e que também pode inibir a atividade dos fatores de transcrição da família Gli, importantes reguladores da via de sinalização Hedgehog (SHIMURA et al., 2004; SHIMURA et al., 2005; MIZUARAI et al., 2009). Esse papel da Gal-3, em parte, contribuiu para elucidar um dos possíveis mecanismos pelos quais essa lectina poderia estar envolvida no processo de transformação maligna em diferentes tumores, inclusive o CE de cavidade bucal.

Sobre isso, o real papel da Gal-3 no desenvolvimento de CE de cavidade bucal ainda necessita ser confirmado. Na tentativa de elucidar isso, o primeiro trabalho publicado na literatura sobre o envolvimento da Gal-3 no complexo mecanismo de transformação maligna de epitélio lingual utilizando um modelo experimental de carcinogênese bucal, revelou um incremento constante e sempre maior, embora não significativo, no número de camundongos WT acometido por carcinoma, quando comparado com camundongos KO, com 100% e 83,3% dos camundongos WT e KO diagnosticados com carcinomas ao final de 32 semanas, respectivamente (FARIA et al.,

2011). Resultado parecido foi encontrado por Le Parco et al. (2009), os quais mostraram que a ausência da Gal-3 não interferiu no desenvolvimento de tumores de cólon e mama, bem como na incidência de metástases, sugerindo a existência de mecanismos adaptativos compensadores mediados por outros membros da família das glectinas durante o desenvolvimento tumoral em resposta à ausência de Gal-3 (LE PARCO et al., 2009). Isso pode ser corroborado pelo fato de que animais KO não apresentam anormalidades no seu desenvolvimento, reforçando a ideia de que a Gal-3 pode desempenhar um papel redundante no meio intracelular. Em contraste, no estudo de Abdel-Aziz et al. (2008), uma diferença significativa na incidência de tumores pulmonares em camundongos WT, em comparação com camundongos KO, ao final de 32 semanas foi observada, sugerindo um forte papel para Gal-3 no desenvolvimento desses tumores, o que pareceu estar relacionado com maior ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (ABDEL-AZIZ et al., 2008).

Diante desses achados e para melhor compreender o envolvimento dessa lectina no processo de transformação maligna de tecido epitelial lingual induzido por um potente carcinógeno, e se isso poderia estar associado à ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina, um recente trabalho publicado pelo nosso grupo identificou a via Wnt ativa em ambos os grupos de camundongos (SANT'ANA et al., 2011). Nesse estudo, foi mostrado uma predominância de expressão de  $\beta$ -catenina não membranosa, um marcador de via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina ativa, tanto nas displasias quanto nos carcinomas em ambos os grupos WT e KO (SANT'ANA et al., 2011). A conclusão desse estudo foi diferente daquilo que se postulava até então para Gal-3 na literatura, ou seja, que a presença dessa lectina seria necessária para a ativação da via de sinalização Wnt (SHIMURA et al., 2004; ABDEL-AZIZ et al., 2008). Essa hipótese foi posteriormente confirmada por Song et al. (2009), os quais encontraram, em células de câncer de cólon expressando níveis elevados de Gal-3, um grande acúmulo de  $\beta$ -catenina no núcleo bem como aumento da atividade dos fatores de transcrição LEF/TCF4 (SONG et al., 2009).

Assim, para confirmar os nossos resultados preliminares, é que procuramos nesse estudo analisar a expressão de glicoproteínas Wnt-1 e Wnt-3A, ambas ativadoras da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, o que até o presente momento não tem sido descrito na literatura, em especial em um modelo de carcinogênese bucal experimental em camundongos KO. Tanto a Wnt-1 quanto a Wnt-3A ligam a receptores de superfície celular da família Frizzled (FZ), inativando o complexo de destruição APC-Axina-

GSK-3 $\beta$ , cuja consequência é o acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma e sua translocação para o núcleo para ativar a transcrição de genes envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celulares, tais como MYC e CCND1 (MACDONALD et al., 2009; DAKENG et al., 2012). Assim, os resultados mostrados aqui revelaram uma completa ausência de expressão da proteína Wnt-1 nas lesões analisadas (displasias e carcinomas) nos dois grupos estudados. A proteína Wnt-1 tem sido implicada com o desenvolvimento e diferenciação de carcinomas de cabeça e pescoço em humanos, como descrito por Lo Muzio et al. (2002). Nesse estudo, os autores encontraram uma maior expressão de Wnt-1 e de  $\beta$ -catenina citoplasmática em amostras de carcinoma de células basais nas áreas de infiltração e desdiferenciação quando comparadas com amostras de pele normal (LO MUZIO et al., 2002). Além disso, Rhee et al., (2002) encontraram níveis elevados de mRNA e da proteína Wnt-1 em cultura de células de CE de cabeça e pescoço do que em células do epitélio oral normal. Não obstante a isso, esses autores ainda relataram que, na presença do anticorpo anti-Wnt-1, uma redução da atividade do fator de transcrição TCF/LEF e menor expressão de ciclina D1 e  $\beta$ -catenina foi observado, indicando a importância dessa proteína na ativação da via de sinalização Wnt neste tipo de neoplasia (RHEE et al., 2002). Em um modelo experimental muito semelhante, Fracalossi et al. (2011) relataram, na maioria dos carcinomas e displasias desenvolvidos durante a carcinogênese bucal induzida por 4NQO em ratos, a expressão de Wnt-1, indicando que esta proteína poderia ser importante durante a transformação maligna da mucosa oral (FRACALOSSO et al., 2011). Em contraste, uma ausência de sinal para proteína Wnt-1 em leucoplasias tem sido recentemente descrito na literatura, indicando que esse membro da família Wnt é improvável de estar envolvido na transformação maligna dessas lesões (ISHIDA et al., 2007). Assim, é provável que a Wnt-1 não esteja de fato envolvida na transformação maligna de epitélio lingual de camundongos.

Contudo, é pertinente discorrer um pouco sobre a técnica empregada no estudo. É de amplo conhecimento que a imunohistoquímica apresenta limitações, especialmente no que diz respeito à recuperação antigênica, a qual está na dependência de uma correta fixação e processamento adequado das amostras. Somado a isso, é possível que o anticorpo empregado tenha uma baixa ou uma ausência de imunoreatividade em tecidos de camundongos. Aqui, o anticorpo empregado contra a proteína Wnt-1 apresenta reatividade contra tecido de camundongos e o protocolo empregado para realização da

técnica foi o mesmo que estabelecido pelo fabricante. Assim, para confirmar nossos resultados e conclusões, a utilização de técnicas mais sensíveis e específicas para a detecção dos níveis dessa glicoproteína ou de seu mRNA se faz necessário.

Em relação à proteína Wnt-3A, a sua expressão foi observada em ambos os grupos de camundongos. Embora a média de positividade para Wnt-3A tivesse sido maior no grupo WT do que no grupo KO, não foi possível identificar o envolvimento dessa glicoproteína no processo de transformação maligna do epitélio lingual em ambos os grupos. Da mesma forma, na análise intragrupo e intergrupo também nenhuma diferença foi alcançada. O papel da Wnt-3A em tumores ainda necessita ser esclarecido. Enquanto alguns estudos têm demonstrado uma associação entre Wnt-3A e crescimento celular em células de câncer de próstata e em amostras de leucoplasia de cavidade bucal com displasia, outros têm mostrado uma reduzida proliferação celular em células de melanoma humano, indicando que o papel das proteínas Wnts está na dependência do tipo celular (VERRAS et al., 2004; ISHIDA et al. 2007; CHIEN et al., 2009). Isso pôde ser confirmado a partir de um trabalho de monografia realizado em nosso laboratório, em que o índice de positividade para ciclina D1 não estava relacionado com o desenvolvimento de carcinomas na língua de camundongos WT e KO (LOPES, 2011). Contudo, esse estudo não permite descartar um papel para essa via no complexo mecanismo que leva à transformação maligna de células do epitélio lingual de camundongos. Enfim, esses resultados permitem concluir que a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina está ativa em ambos os grupos, o que pode, em parte, explicar a ausência de significância na incidência de tumores entre eles (FARIA et al., 2011; SANT'ANA et al., 2011).

Outra via de sinalização investigada no presente estudo foi a via Hedgehog (Hh). Essa via de sinalização é principalmente mediada pela proteína Shh, uma molécula que atua ativando um complexo protéico de membrana plasmática formado pelos receptores Patched (Ptch) e Smoothed (Smo) (TANG et al., 2007). Quando Shh se liga à proteína Ptch, a atividade de Smo é liberada, permitindo a ativação de fatores de transcrição da família Gli (Gli-1, Gli-2 e Gli-3), os quais promovem um aumento da transcrição de genes via Hh, tais como CCND1, CCND2, MYC e BCL2 (KATOH; KATOH, 2009; XUAN et al., 2006). Por outro lado, num estado repressivo, as proteínas Gli-1 e Gli-2 são fosforiladas pela Gsk-3 $\beta$  e levadas a degradação pelo sistema ubiquitina-proteossomo (SCHNEIDER et al., 2010). Diferente disso, quando a GSK-3 $\beta$

fosforila Gli-3, ocorre uma ativação de sua função repressora da transcrição gênica, o que é inibido quando a via Hh está ativa (MILL et al., 2005; ZHOU et al., 2006; KISE et al., 2009). Somado a isso, GSK-3 $\beta$  também apresenta um papel fundamental na via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, regulando o *pool* de  $\beta$ -catenina no citoplasma através de sua fosforilação e degradação via sistema ubiquitina-proteossomo (DAKENG et al., 2012). Sabe-se ainda que a Gsk-3 $\beta$  pode ser fosforiladas em resíduos de serina ou treonina, os quais determinam sua habilidade em atuar sobre alvos proteínas intracelulares, sendo essa função atenuada através da fosforilação de seu resíduo de serina 9, tornando-a inativa (Gsk-3 $\beta$  Ser9), a qual tem sido implicada com o desenvolvimento de doenças, incluindo o câncer (MISHRA et al., 2010).

Um dos propósitos de se investigar a via de sinalização Hh nesse estudo partiu de um trabalho recentemente publicado por pesquisadores do nosso laboratório usando esse modelo experimental de carcinogênese bucal, no qual foi observado que a expressão de GSK-3 $\beta$  Ser9 (inativa) estava significativamente associada com transformação maligna do epitélio lingual no grupo WT, mas não no grupo KO (MENDONÇA et al., 2012). Não obstante a isso, foi recentemente demonstrado que a presença de sinalização Hh ativa influencia grandemente os níveis da forma inativa da Gsk-3 $\beta$  em pele embrionária de camundongos (MILL et al., 2005). Assim, levando em consideração o papel da GSK-3 $\beta$  na via de sinalização Hh e os resultados sobre o envolvimento da sua forma inativa na evolução das displasias para carcinomas em camundongos WT, postulou-se que nesses animais a via Hh poderia estar ativada de forma mais intensa do que nos camundongos KO. De fato, os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir tal hipótese, visto que a média de positividade de Shh foi sempre maior no grupo WT do que no grupo KO e que isso estava significativamente associado com transformação maligna desse epitélio. Interessante, na análise intergrupo, a expressão dessa proteína foi também significativamente maior no grupo WT do que em relação ao grupo KO em todos os cruzamentos realizados.

Trabalhos previamente publicados têm mostrado que a proteína Shh está de fato envolvida na progressão de lesões pré-malignas a malignas. Xuan et al. (2006), avaliando comparativamente a imunomarcagem desta proteína em carcinoma de células escamosas de cérvix uterina, em lesões precursoras de diferentes graus e no epitélio cervical normal, observaram um aumento significativo na expressão de Shh do epitélio normal para as lesões pré-malignas e destas para os carcinomas (XUAN et al., 2006).

De forma similar, Wang et al. (2006) encontraram um aumento significativo de Shh na transição de metaplasia para displasia, como também nos estágios iniciais a avançados de carcinoma gástrico (WANG et al., 2006). Esses dados corroboram os nossos achados, imputando à via de sinalização Hh envolvimento com transformação maligna em camundongos WT.

Em relação à proteína Gli-3, pouco ainda é conhecido sobre seu papel em câncer. Em CE de cavidade bucal, existem poucos dados na literatura relacionando proteínas Gli com essa doença e a maioria dos trabalhos foca na expressão de Gli-1 e Gli-2 (BUIM et al., 2011; YAN et al., 2011; WANG et al., 2011). Entretanto, não há estudos avaliando a expressão de Gli-3 em modelos experimentais de camundongos para melhor elucidar o papel dessa proteína no desenvolvimento CE e como a sua expressão pode ser influenciada pela Gal-3. Nesse estudo, observou-se uma redução na expressão de Gli-3 na evolução de displasia leve a carcinoma no grupo WT, enquanto que no grupo KO ocorreu o contrário, ou seja, um discreto aumento. Além disso, comparando a expressão de Gli-3 entre displasia e carcinoma de cada grupo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada, como também na análise intergrupo. Como mencionado anteriormente, Gli-3 é uma proteína de 190 kDa que, após processamento proteolítico mediado pela GSK-3 $\beta$ , passa a apresentar uma função repressora de transcrição gênica, em especial de genes que regulam a proliferação celular (TEMPE et al., 2006). Este processo de clivagem e formação da forma repressora de Gli-3 ocorre após a sua fosforilação por GSK-3 $\beta$ , o que em parte é pode ser bloqueado quando da presença de uma via Hh ativa (TEMPLE et al., 2006; KISE et al., 2009). Uma vez que no grupo WT os níveis de GSK-3 $\beta$  inativa eram maiores, bem como os de Shh, esperávamos observar uma maior expressão de Gli-3 neste grupo, fato que não foi observado. A princípio, com base em nossos resultados, acreditamos que a sua expressão não é influenciada pela ausência de Gal-3 e que não apresente uma função regulatória importante durante o processo de transformação maligna do epitélio oral.



## 7- CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstrou que a ausência da Gal-3 não interfere na ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, uma vez que não observamos a expressão de Wnt-1 em nenhuma das lesões analisadas e nenhuma diferença estatisticamente significativa na expressão de Wnt-3A entre os camundongos WT e KO, corroborando achados anteriores descritos na literatura. Além disso, a expressão de Wnt-3A não diferiu entre as displasias e carcinomas nos dois grupos de animais, sugerindo que a ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, embora presente, não parece influenciar na transformação maligna do epitélio lingual. Por outro lado, os resultados indicaram uma forte ativação da via de sinalização Hh no grupo WT quando comparado com o grupo KO, em especial nos estágios finais da carcinogênese bucal quando há formação de carcinomas, o que pode estar associado com o acúmulo de grande quantidade da forma inativa da GSK-3 $\beta$ . Os nossos resultados revelaram ainda um aumento significativo da expressão de Shh das displasias para os carcinomas, sugerindo que a via de sinalização Hh está intensamente ativa durante a malignização das lesões de língua. Por tudo isso, acreditamos que estudos mais detalhados sobre o papel da via de sinalização Hh durante a carcinogênese bucal, bem como dos mecanismos pelos quais a Gal-3 modula esta via, podem ser promissores para a identificação de possíveis marcadores prognósticos que auxiliem na identificação de lesões com potencial de transformação maligna, possibilitando o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ, H.O.; MURAI, Y.; TABUCHI, Y.; ZHENG, H.C.; NOMOTO, K.; TAKAHASHI, H.; TSUNEYAMA, K.; KATO, I.; HSU, D.K.; LIU, F.T.; HIRAGA, K.; TAKANO, Y. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to NNK-induced lung tumorigenesis: an oligonucleotide microarray study. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 134, p. 777-788, 2008.
- ABRAHAM, S.C.; KLIMSTRA, D.S.; WILENTZ, R.E.; YEO, C.J.; CONLON, K.; BRENNAN, M.; CAMERON, J.L.; WU, T.T.; HRUBAN, R.H. Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor  $\beta$ -catenin mutations. **American Journal of Pathology**, v.160, p. 1361- 1369, 2002.
- AKAHANI, S.; NANGIAMAKKER, P.; INOHARA, H.; KIM, H.R.; RAZ, A. Galectin3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl2 family. **Cancer Research**, v. 57, n. 23, p. 5272-5276, 1997.
- ALTABA, A. R. Gli proteins and hedgehog signaling in developmental and cancer. **Trends in Genetics**, v.15, p. 418-425, 1999.
- AMIT, S.; HATZUBAI, A.; BIRMAN, Y.; et al. Axin-mediated CKI phosphorylation of  $\beta$ -catenin at Ser 45: a molecular switch for the WNT pathway. **Genes and Development**, v. 16, p.1066-1076, 2002.
- ANASTAS, J.N.; MOON, R.T. WNT signaling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nature Reviews**, v. 13, p.11-24, 2013.
- ANTÓN-APARICIO, L.M.; GARCÍA CAMPELO, R; CASSINELLO ESPINOSA, J. Prostate cancer and Hedgehog signaling pathway. **Clinical and Translation Oncology**, v. 9, p. 4220-4228, 2007.
- AQUILERA, O.; FRAGA, M.F.; BALLESTAR, E.; PAZ, M.F.; ESPADA, J.; GARCIA, J.M.; MUNOZ, A.; ESTELLER, M.; GONZALEZ-SANCHO, J.M. Epigenetic inactivation of the WNT antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. **Oncogene**, v. 29, p. 4116-4121, 2006.
- ARIMA, Y.; NISHIGORI, C.; TAKEUCHI, T.; OKO, S.; MORIMOTO, K.; UTANI, A.; MIYACHI, Y. 4- Nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblast through reactive oxygen species. **Toxicological Sciences**, v. 91, p. 382-392, 2006.
- ASZTERBAUM, M.; ROTHMAN, A.; JOHNSON, R.L.; FISHER, M.; XIE, J.; BONIFAS, J.M. ZHANG, X.; SCOTT, M.P.; EPSTEIN Jr, E.H. Identification of mutation in human PATCHED gene in sporadic basal cell carcinomas and in patients with basal cell nevus syndrome. **Journal of Investigative Dermatology**, v.110, p.885-888, 1998.
- BARNES L, EVESON JW, REICHART P, SIDRANSKY D. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours 2005. **IARC Press**, Lyon.

BARROW, H.; RHODES, J.M.; YU, L.G. The role of galectins in colorectal cancer progression. **International Journal of Cancer**, v.129, p.1-8, 2011.

BEACHY, P.A.; KARHADKAR, S.S.; BERMAN, D.M. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. **Nature**, v.432, p. 324–331, 2004.

BERMAN, D.M.; KARHADKAR, S.S.; MAITRA, A. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. **Nature**, v. 425, p. 846-851, 2003.

BHATTACHARYA, R.; KWON, J.; ALI, B.; WANG, E.; PATRA, S.; SHRIDHAR, V.; MUKHERJEE, P. Role of hedgehog signaling in ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**, v.14, p.7659-7666, 2008.

BIAN, Y.H.; HUANG, S.H.; YANG, L.; MA, X.L.; XIE, J.W.; ZHANG, H.W. Sonic hedgehog- Gli1 pathway in colorectal adenocarcinomas. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, p. 1659–1665, 2007.

BREUHAHN, K.; LONGERICH, T.; SCHIRMACHER, P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v.25, p. 3787-3800, 2006.

BRUNNER, M.; THURNHER, D.; PAMMER, J.; HEIDUSCKA, G.; PETZELBAUER, P.; SCHIMID, C.; SCHNEIDER, S.; EROVIC, B.M. Expression of Hedgehog signaling molecules in Merkel cell carcinoma. **Head and Neck**, v. 10, p. 333-340, 2010.

BUIM, M. E.C.; GURGEL, C.A.S.; RAMOS, E.A.G.; LOURENÇO, S.V.; SOARES, F.A. Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **Human Pathology**, v. 42, p. 1484-1490, 2011.

CALIFICE, S.; CASTRONOVO, V.; BRACKE, M.; VAN DEN BRULE, F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene**, v. 23, p. 7527-7536, 2004.

CASTRONOVO, V.; VAN DEN BRULE, F.A.; JACKERS, P.; CLAUSSE, N.; LIU, F.T.; GILLET, C.; SOBEL, M.E. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. **The Journal of Pathology**, v. 179, p. 43-48, 1996.

ÇAY, T. Immunohistochemical expression of galectin-3 in cancer: A review of the literature. **Derleme**, v. 28, p.1-10, 2012.

CLEMENTS, W. M.; WANG, J.; SARNAIK, A.  $\beta$ -catenin mutation is a frequent cause of WNT activation in gastric cancer. **Cancer Research**, v.62, p. 3503-3506, 2002.

CHAN, S.L.; CUI, Y.; VAN HASSELT, A.; SRIVASTAVA, G.; JIN, H.; NQ, K.M.; WANG, Y.; LEE, K.T.; TSAO, G.S.; ZHONG, S.; ROBERTSON, K.D.; RHA, S.Y.; CHAN, A.T.; TAO, Q. The tumor suppressor WNT inhibitory factor 1 is frequently methylated in nasopharyngeal and esophageal carcinomas. **Laboratory Investigation**, v. 87, p. 344-650, 2007.

CHEN, J.K.; TAIPALE, J.; YOUNG, K.E.; MAITI, T.; BEACHY, P.A. Small molecule modulation of Smoothened activity. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 99, p.14017-14016, 2002.

CHEN, B.Y.; LIU, J.Y.; CHANG, H.H.; CHANG, C.P.; LO, W.Y.; KUO, W.H.; YANG, C.R.; LIN, D.P. Hedgehog is involved in prostate basal cell hyperplasia formation and its progressing towards tumorigenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 357, p.1084-1089, 2007.

CHEN, Y.K.; LIN, L.M. DMBA- induced hamster bucal pouch carcinoma and VX2-induced rabbit cancer as a model for human oral carcinogenesis. **Expert Reviews of Cancer Therapy**, v.10, p.1485-1496, 2010.

CHIEN, A.J.; MOORE, E.C.; LONSDORF, A.S.; KULIKAUSKAS, R.M.; ROTHBERG, B.G.; BERGER, A.J.; MAJOR, M.B.; HWANG, S.T.; RIMM, D.L.; MOON, R.T. Activated WNT/ $\beta$ -catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 106, p.1193-1198, 2009.

CHIARIOTTI, L.; SALVATORE, P.; BENVENUTO, G.; BRUNI, C.B. Control of galectin gene expression. **Biochimica**, v.81, p. 381-388, 1999.

CHIU, C.G.; STRUGNELL, S.S.; GRIFFITH, O.L.; JONES, S.J.M.; GOWN, A.M.; WALKER, B.; NABI, I.R.; WISEMAN, S. Diagnostic utility of galectin-3 in thyroid cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 176, p. 2067-2080, 2010.

COHEN, M.M. The hedgehog signaling network. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v.123, p. 5-28, 2003.

COLNOT, C.; FOWLIS, D.; RIPOCHE, M.A.; BOUCHAERT, I.; POIRIER, F. Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. **Developmental Dynamics**, v.211, p. 306-313, 1998.

DAKENG, S.; DUANGMANO, S.; JIRATCHARIYAKUL, W.; PRATYA, Y.; BO, O.; GLER; PATMASIRIWAT, P. Inhibition of WNT Signaling by Cucurbitacin B in Breast Cancer Cells: Reduction of WNT Associated Proteins and Reduced Translocation of Galectin-3-Mediated  $\beta$ -Catenin to the Nucleus. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, p. 49-60, 2012.

DIHLMANN, S.; DOEBERITZ, M.K. WNT/ $\beta$ -catenin pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. **International Journal of Cancer**, v. 113, p. 515-524, 2005.

DOUARD, R.; MOUTEREAU, S.; PERNET, P.; CHIMINGQI, M.; ALLORY, Y.; MANIVET, P.; CONTI, M.; VAUBOURDOLLE, M.; CUGNENC, P.H.; LORIC S. Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. **Surgery**, v. 139, p.665-670, 2006.

DOUCAS, H.; GARCEA, G.; NEAL, C.P.; MANSON, M.M.; BERRY, D.P. Changes in the WNT signaling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 365-379, 2005.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLOGEL, M. Galectin3: An openended story. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, n. 4, p. 616635, 2006.

EICHENMULLER, M.; GRUNER, I.; HAGL, B.; HABERLE, B.; MULLER HOCKER, J.; VON SCHWEINITZ, D.; KAPPLER, R. Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastomagowth. **Hepatology**, v.49, p.482–490, 2009.

ESPADA, J.; CALVO, M.B.; DIAS-PRADO, S.; MEDINA, V. WNT signalling and cancer stem cells. **Clinical and Translational Oncology**, v. 11, p. 411-427, 2009.

EVERSON, J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. **Journal of Oral Pathology**, v. 10, p. 129-146, 1981.

FARIA, P.R.; CHAMMAS, R.; MELO, T.L.; HSU, D.K.; LIU, F.T.; NONOGAKI, S.; CARDOSO, S.V.; LOYOLA, A.M. Absence of galectin-3 does not affect the development of experimental tongue carcinomas in mice. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 90, p. 189-193, 2011.

FRACALOSSO, A.C.C.; SILVA, M.S.; OSHIMA, C.T.F.; RIBEIRO, D.A. WNT/ $\beta$ -catenina signalling pathway following rat tongue carcinogenesis induce by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, p. 176-183, 2010.

FUJII, M.; KATASE, N.; LEFEUVRE, M.; GUNDUZ, M.; BUERY, R.R.; TAMAMURA, R.; TSUJIGIWA, H.; NAGATSUKA, H. Dickkopf (Dkk)-3 and  $\beta$ -catenin expressions increased in the transition from normal oral mucosal to oral squamous cell carcinoma. **Journal of Molecular Histology**, v. 42, p. 499-504, 2011.

FUJIMORI, M.; IKEDA, S.; SHIMIZU, Z. Accumulation of  $\beta$ -catenin protein and mutations in exon 3 of  $\beta$ -catenin gene in gastrointestinal carcinoid tumor. **Cancer Research**, v. 61, p. 6656-6659, 2001.

FUKUMORI, T.; TAKENAKA, Y.; YOSHII, T. et al. CD29 and CD27 mediate galectin-3 induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Research**, v.63, p. 8302-8311, 2003.

GAO, S.; EIBERG, H.; KROGDAHL, A.; LIU, C.J.; SORENSEN, J.A. Cytoplasmic expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin correlated with LOH and hipermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. **Journal of oral Pathology and Medicine**, v. 34, p. 116-119, 2005.

GERSTEIN, A.V.; ALMEIDA, T.A.; ZHAO, G.; CHESS, E.; SHIH, L.M.; BUHLER, K.; PIENTA, K.; RUBIN, M.A.; VESSELA, R.; PAPADOPOULOS, N. APC/CTNNB1 ( $\beta$ -catenin) pathway alterations in human prostate cancers. **Genes Chromosomes Cancer**, v.34, p. 9-16, 2002.

GILES, R.H.; VAN ES, J.H.; CLEVERS. Caught up in a WNT storm: WNT signaling in cancer. **Biochimical and Biophysica Acta**, v. 1653, p.1-24, 2003.

GILLENWATER, A.; XU, X.C.; EL NAGGAR, A.K.; CLAYMAN, G.L.; LOTAN, R. Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. **Head and Neck**, v.18, p. 422-432, 1996.

GOTO, H.; KAWANO, K.; KOBAYASHI, I.; SAKAI, H.; YANAGISAWA, S. Expression of cyclin D1 and Gsk3 beta and their predictive value of prognostic in squamous cell carcinomas of tongue. **Oral Oncology**, v38, p.548-556, 2002.

HAGEN, T.; PUIG, A.V. Characterisation of the phosphorylation of  $\beta$ -catenin at the GSK-3 priming site Ser45. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 294, p.324-328, 2002.

HAUDEK, K. C.; SPRONK, K.J.; VOSS, P. G.; PATTERSON, R.J.; WANG, J.L.; ARNOYS, E.J. Dynamics of Galectin-3 in the Nucleus and Cytoplasm. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1800, p.1- 20, 2011.

HEGDE, G.V.; MUNGER, C.M.; EMANUEL, K.; JOSHI, A.D.; GREINER, T.C.; WEISENBURGER, D.D.; VOSE, J.M.; JOSHI, S.S. Targeting of sonic hedgehog-GLI signaling: a potential strategy to improve therapy for mantle cell lymphoma. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, p.1450–1460, 2008.

HERNANDEZ, A.B.O.; SOLANO, M.R.; CANALES, I.D.M.; CASTRO, B.G.; REYNOSO, M.A.R.; AVINA, J.A.R.; CHAIREZ, E.B.; LAZARENO, P.C.O.; FLORES, G.H. Peripheral T-lymphocytes express WNT7a and its restoration in leukemia-derived lymphoblast inhibits cell proliferation. **Biomed Central Cancer**, v.12, 2012.

HONJO, Y.; INOHARA, H.; AKAHANI, S.; YOSHII, T.; TAKENAKA, Y.; YOSHIDA, J.; HATTORI, K.; TOMIYAMA, Y.; RAZ, A.; KUBO, T. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p.4635–4640, 2000.

HUANG, C.L.; LIU, D.; ISHIKAMA, S.; NAKASHIMA, T.; NAKASHINA, N.; YOKOMIS E, H.; KADOTA, K.; UENO, M. WNT1 overexpression promotes tumors progression in non-small cell lung cancer. **European Journal of Cancer**, v.44, p.2680-2688, 2008.

HUGHES, R.C; Galectins as modulators of cell adhesion; **Biochimie**, v.83, p.667-676, 2001. 2001.

INCA. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 20 dez. 2012.

ISHIDA, K.; ITO, S.; WADA, N.; DEGUCHI, H.; HATA, T.; HOSODA, M.; NOHNO, T. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. **Molecular Cancer**, v.62, p.1-7, 2007.

IWAI, S.; KATAGIRI, W.; KONG, C.; AMEKAWA, S.; NAKAZAMA, M.; YURA, Y. Mutations of the APC, beta-catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation

of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 131, p.773-782, 2005.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T. Cancer statistic. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, p. 71-96, 2008.

JOHNSON,R.L.; ROTHMAN,A.L.; XIE,J.; GOODRICH,L.V.; BARE,J.W.; BONIFAS,J.M.; QUIM,A.G.; MYERS,R.M.; COX,D.R.; EPSTEIN Jr, E.H.; SCOTT, M.P. Human homolog of patched, a candidate gene for basal cell nevus syndrome. **Science**, v.272, p. 1668-1671, 1996.

KANOJIA, D.; VAIDYA, M.M. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis.**Oral oncology**, v. 42, p. 655-667, 2006.

KARHADKAR, S.S.; BOVA, G.S.; ABDALLAH, N.; DHARA, S.; GARDNER, D.; MAITRA, A.; ISAACS, J.T.; BERMAN, D.M.; BEACHY, P.A. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasm and metastasis. **Nature**, v.431, p.707–712, 2004.

KATOH, Y.; KATOH, M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling. **Current Molecular Medicine**, v. 9, p. 873-886, 2009.

KINZLER, K.W.; RUPPERT; BIGNER, S.H. The Gli gene is a member of Kruppel family of zinc finger protein. **Nature**, v. 30, p.434-442, 1988.

KISE, Y.; MORINAKA, A.; TEGLUND, S.; MIKI, H. Sufu recruits GSK-3 $\beta$  for efficient processing of Gli-3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.387, p. 569-574, 2009.

KLAUS, A.; BIRCHMEIER,W. WNT signaling and its impact on development and cancer. **Nature Reviews**, v. 8, p. 387-398, 2008.

KOBAYASHI, T.; SHIMURA, T.; YAJIMA, T.; KUBO,N.; ARAKI, K.; TSUTSUMI, S.; SUZUKI, H.; KUWANO, H.; RAZ, A. Transient gene silencing of galectin-3 suppress pancreatic cancer cell migration and invasion through degradation of  $\beta$ -catenin. **International Journal of Cancer**, v. 129, p. 2775-2786, 2011.

KOGERMAN, P.; GRIMM, T.; KOGERMAN, L.;KRAUSE, D.; UNDER,A.B.; SANDSTEDT,B.;TOFTGARD,R.;ZAPHIROPOULOS, P.G. Mammalian Supressor of Fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. **Nature Cell Biology**, v.1, 1999.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins and Cotran: Patologia- Bases Patológicas das doenças. 7ª Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2004.

LARGEY, J.S.; MELTZER S.J.; SAUK, J.J.; HEBERT, C.A.; ARCHIBALD, D.W.Loss of heterozygosity involving the APC gene in oral squamous cell carcinomas. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology,Oral Radiology**, v. 77, p.260–263, 1994.

LEE, J.H.; ABRAHAM, S.C.; KIM, H.S.; NAM, J.H.; CHOI, C.; LEE, M.C.; PARK, C.S.; JUHNG, S.W.; RASHID, A.; HAMITON, S.R.; WU, T.T. Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. **The American Journal of Pathology**, v. 161, p. 611-618, 2002.

LE PARCO, I.; GENDRONNEAU, G.; DANG, T.; DELACOUR, D.; THIJSEN, V.L.; EDELMANN, W.; PEUCHMAUR, M.; POIRIER, F. Genetic assessment of the importance of galectin-3 in cancer initiation, progression, and dissemination. **Glycobiology**, v. 19, p. 68-75, 2009.

LIU, F.T.; PATTERSON, R.J.; WANG, J.L. Intracellular functions of galectins; **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 263-273, 2002.

LIU, F.T.; RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Review Cancer**, v.5, p. 29-41, 2005.

LIU, X.; HE, R.; CHEN, W. A rat model of tongue mucosa squamous cell carcinoma induced by oral administration of 4NQO in drinking water. **Chinese Journal of Stomatology** v. 34, p. 354-356, 1999.

LO MUZIO, L.; PANNONE, G.; STAIBANO, S.; MIGNOGNA, M.D.; GRIECO, M.; RAMIRES, P.; ROMITO, A.M.; DE ROSA, G.; PIATTELLI, A. Wnt-1 expression in basal cell carcinoma of head and neck. An immunohistochemical and confocal study with regard to the intracellular distribution of beta-catenin. **Anticancer Research**, v. 22, p. 565-576, 2002.

LOPES, M.L.C. **Estudo da expressão por imuno-histoquímica da proteína ciclina d1 em displasias e carcinomas de língua de camundongo *knockout* e selvagem para o gene da galectina-3**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Uberlândia, 2011

LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 79, p.321-329, 1995.

LUO, J. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. **Cancer Letters**, v. 273, p. 194-200, 2009.

LUSTIG, B.; BEHRENS. The WNT signaling pathway and its role in tumor development. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 129, p. 199-221, 2003.

MACDONALD, B.T.; TAMAI, K.; XI, HE. WNT/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Developmental Cell**, v. 17, p. 9-26, 2009.

MAKKER, P.N.; HONJO, Y.; SARVIS, R.; AKAHANI, S.; HOGAN, V.; PIENTA, K.J.; RAZ, A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 156, p. 899-909.



MANCHANDA, A.; SHETTY, D.C. Reproducibility of grading systems in oral epithelial dysplasia. **Oral Medicine and Pathology**, v.17, p. 935-942, 2012.

MAO, E.J.; SCHWARTZ, S.M.; DALING, J.R.; BECKMANN, A.M. Loss of heterozygosity at 5q21-22 (adenomatous polyposis coli gene region) in oral squamous cell carcinoma is common and correlated with advance disease. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 27, p.297-302, 1998.

MARKOWSHA, A.I.; LIU, F.T.; PANJWANI, N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF and  $\beta$ -FGF-mediated angiogenic response. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, p. 1981-1993, 2010.

MENDONÇA, D.F.; CHAMMAS, R.; LIU, F.T.; SUELY, N.; CARDOSO, S.V.; LOYOLA, A.M.; FARIA, P.R. The inactive form of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is associated with the development of carcinomas in galectin-3 wild-type mice, but not in galectin-3-deficient mice. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 5, p. 547-554, 2012.

MERLE, P.; DE LA MONTE, S.; KIM, M.; HERMANN, M.; TANAKA, S.; VON DEM BUSSCHE, A. et al. Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 127, p. 1110-1122, 2004.

MIYAKI, M.; LIJIMA, T.; KIMURA. Frequent mutation of  $\beta$ -catenin and APC gene in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 59, p. 4506-4509, 1999.

MILL, P.; MO, R.; HU, M.C.; DAGNINO, L.; ROSENBLUM, N.D.; HUI, C.C. Shh controls epithelial proliferation via independent pathways that converge on N-myc. **Developmental Cell**, v. 9, p. 293-303, 2005.

MIMEAUL, M.; BATRA, S.K. Frequent Deregulations in the Hedgehog Signaling Network and Cross-Talks with the Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Involved in Cancer Progression and Targeted Therapies. **Pharmacological Reviews**, v. 62, p. 497-524, 2010.

MIRZAYANS, R.; BASHIR, S.; MURRAY, D.; PATERSON, M.C. Inverse correlation between p53 protein levels and DNA repair efficiency in human fibroblast strains treated with 4-nitroquinoline 1-oxide: evidence that lesions other than DNA strand breaks trigger the p53 response. **Carcinogenesis**, v.20, p. 941-946, 1999.

MISHRA R. Glycogen synthase kinase 3  $\beta$ : can it be a target for oral cancer. **Molecular Cancer**, v.9, p. 1-15, 2010.

MIYAZAKI, J.; HOKARI, R.; KATO, S.; TSUZUKI, Y.; KAWAGUCHI, A.; NAGAO, S.; ITOH, K.; MIURA, S. Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes. **Oncology Reports**, v. 9, p.1307-1312, 2002.

MIZUARAI, S.; KAWAGISHI, A.; KOTANI. Inhibition of p70S6K2 down-regulates Hedgehog/GLI pathway in non-small cell lung cancer lines. **Molecular Cancer**, v.44, p. 1-10, 2009.

MOLINOLO, A.A.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; SQUARIZE, C.H.; CASTILHO, R.M.; PATEL, V.; GUTKIND, J.S. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncology**, v. 45, p. 324-334, 2009.

NAKAHARA, S.; OKA, N.; RAZ, A. On the role of galectin3 in cancer progression. **Apoptosis**, v. 10, n. 2, p. 267-275, 2005.

NAYLOR, S. et al. retroviral expression of WNT-1 and WNT-7 $\beta$  produces different effects in mouse mammary epithelium. **Journal of Cell Science**, v.113, p.2129-2138, 2000.

NAUTA, J.M.; ROODENBURG, J.L.; NIKKELS, P.G.; WITJES, M.J.; VERMEY, A. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of wistar rat palatal mucosa:4NQO model, v.18, p. 441-449, 1996.

NEWLACZYL, A.U.; YU, L.G. Galectin-3- A jack-off-all- trades in cancer. **Cancer Letters**, v. 313, p. 123-128, 2011.

NILSSON, M.; UNDER, A.B.; KRAUSE, D.; MALMQWIST, U.; RAZA, K. ZAPHIROPOULOS, P.G.; TOFTGARD, R. Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1. . **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.97, p. 3438-3443, 2000.

NUNOSHIBA, T.; DEMPSEY, B. Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-*N*-oxide. **Cancer Research**, v.53, p.3250–3252, 1993.

NUSSE, R.; VARMUS, H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. **Cell**, v.31, p. 99–109, 1982.

NÜSSELEIN-VOLHARD, C.; WIESCHAUS, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. **Nature**, v.287, p.795–801, 1980.

ODA, H.; YASUO, I.; NAKATSURU, Y.; Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. **Cancer Research**, v. 56, p. 3320-3323, 1996.

OGDEN, S.K.; ASCANO, M.; STEGMAN, M.A.; ROBBINS, D.J. Regulation of Hedgehog signaling: a complex story. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p.805-814, 2004.

OHTA, M.; TATEISHI, K.; KANAI, F.; WATABE, H.; KONDO, S.; GULENG, B.; TANAKA, Y.; ASAOA, Y.; JAZAG, A.; IMAMURA, J. p53-independent negative regulation of p21/ cyclin-dependent kinase-interacting protein 1 by the sonic hedgehog-glioma associated oncogene 1 pathway in gastric carcinoma cells. **Cancer Research**, v.65, p.10822– 10829, 2005.

OKINO, K.; NAGAI, H.; HATTA, M.; NAGAHATA, T.; YONEYAMA, K.; OHTA, Y.; JIN, E.; KAWANAMI, O.; ARAKI, T.; EMI, M. Up-regulation and overproduction of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in cervical squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**, v. 10, p.1219-1223, 2003.

ONISCU, A.; JAMES, R.M.; MORRIS, R.G.; BADER, S.; MALCOMSON, R.D.; HARRISON, D.J. Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia. **The Journal of Pathology**, v. 203, p.909–917, 2004.

PISANI, B.; BRAY, F.; PARKIN, D.M. Estimatives of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. **International Journal of Cancer**, v. 97, p. 72-81, 2002.

POLAKIS, P. WNT signaling and cancer. **Genes and Development**, v. 14, p. 1837-1851, 2000.

PRADO,S.M.D.;VILLAAMIL,V.M.;GALLEGO,G.A.;CALVO,M.B.;CEDRUN,J.L.L.; SOLIVA,S.S.;AYERBES,M.V.; CAMPELO,R.G.; APARICIO,L.M.A. Expression of WNT gene family and frizzled receptors in head and neck squamous cell carcinomas. **Virchows Arch**, v.455, p. 65-75, 2009.

QIANG, Y.W.; WALSH, K.; YAO, L.; KEDEI, N.; BLUMBERG, P.M.; RUBIN, J.S.; SHAUGHNESSY, J.; RUDIKOFF, S. WNT induce migration and invasion of myeloma plasma cells. **Blood :The American Society of Hematology** ,v.106, p. 1786-1793, 2005.

RAMACHANDRAN, I.; THAVATHIRU, E.; RAMALINGAM, S.; NATARAJAN, G.; MILLS, W.K.; BENBROOK, D.M.; ZUNA, R.; LIGHLFOOT, S.; REIS, A.; ANANT, S.; QUEIMADO, L. WNT inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis. **Oncogene**, v. 31, p. 2725-2737, 2011.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.14, p. 47-62, 2003.

RHEE, C.S.; SEN,M.; LU,D.; WU,C.; LEONI,L.; RUBIN,J.; CORR,M.; CARSON,D.A. WNT and frizzled receptors as potential targets for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. **Oncogene**, v.21, p.6598-6605,2002.

SAEGUSA, M.; HASHIMURA, M.; YOSHIDA, T.; OKAYASU, I.;  $\beta$ -catenin mutation and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, v. 84, p. 209-217, 2001.

SAEGUSA, M.; HASHIMURA, M.; YOSHIDA, T.; OKAYASU, I.  $\beta$ - catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, v. 84, p. 209-217, 2001.

SANCHEZ, P.; HERNANDEZ, A.M.; STECCA, B.; KAHLER, A.J.; DEGUEME, A.M.; BARRETT, A.; BEYNA, M.; DATTA, M.W.; DATTA, S.; ALTABA, A. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with sonic hedgehog-GLI1

signaling. . **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.101, p.12561–12566, 2004.

SANTANA, J.M.; CHAMMAS,R.; LIU,F.T.; NONOGAKI, S.; CARDOSO, S.V.; LOYOLA, A.M.; FARIA, P.R. Activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway during oral carcinogenesis process is not influenced by the absence of galectin-3 in mice. **Anticancer Research**, v. 31, p.2805-2811, 2011.

SATO, H.; SUZUKI, H.; TOYOTA, M.; NOJIMA, M.; MARUYAMA, R.; SASAKI, S.; TAKAGI, H.; SOGABE, Y.; SASAKI, Y.; IDOGAWA,M.; SONODA, T.; MORI, M.; IMAI, K.; TOKINO, T.; SHINOMURA, Y. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 2459-2466, 2007.

SAYANS, M.P.; PENARANDA, J.M.S.; CARNERO, M.H.; DIZ, P.G.; ANGUEIRA, F.B.; REY, J.M.G.; GARCIA, A.G. The role of adenomatous polyposis coli (APC) in oral squamous cell carcinoma.**Oral Oncology**, v. 28.P. 56-60, 2012.

SCHEPMAN, K.P; VAN DER MEIJI, E.H.; SMEELE, L.E; VAN DER WALL, I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. **Oral Oncology**, v. 34, p. 270-275, 1998

SCHNEIDER, S.; THURNHER, D.; KLOIMSTEIN, P.; LEITNER, V.; PETZELBAUER, P.; PAMMER, J.; BRUNNER, M.; EROVIC, B.M. Expression of the sonic hedgehog pathway in squamous cell carcinoma of the skin and the mucosa of head and neck. **Head and Neck**, v. 33, p. 244-250, 2011.

SHIMIZU, H. et al. Transformation by WNT family proteins correlates with regulation of  $\beta$ -catenin. **Cell Growth and Differentiation**, v. 8, p.1349-1358, 1997.

SHIMURA, T.; TAKENAKA, Y.; TSUTSUMI, S.; HOGAN, V.; KIKUCHI, A.; RAZ, A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. **Cancer Research**, v.64, p. 6363–6367, 2004.

SHIMURA, T.; TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; TSUTSUMI, S.; OKADA, K.; HOGAN, V.; KIKUCHI, A.; KUWANO, H.; RAZ, A. Implication of galectin-3 in WNT signaling. **Cancer Research**, v. 65, p. 3535–3537, 2005.

SHIRATSUCHI, H.; NAKASHIMA, T.; HIRAKAWA, N.; TOH, S.; NAKAGAWA, T.; SAITO, T.; TSUNEYOSHI, M.; KOMUNE, S.  $\beta$ -catenin nuclear accumulation in head and neck mucoepidermoid carcinoma: its role in cyclin D1 overexpression and tumor progression. **Head and Neck**, p. 577-584, 2007.

SIKDAR, N.; PAUL, R.R.; PANDA, C.K.; BANERJEE, S.K.; ROY, B. Loss of heterozygosity at APC and MCC genes of oral cancer and leukoplakia tissue from Indian tobacco chewers. **Journal of Oral Pathology**, v. 32, p.450-454, 2003.

SILVA, S.D.; FERLITO, A.; TAKES, R.P.; BRAKENHOFF, R.H.; VALENTIN, M.D.; WOOLGAR, J.A.; BRADFORD, C.R.; RODRIGO, J.P.; RINALDO, A.; HIER, M.P.;

KOWALSKI, L.P. Advances and applications of oral cancer basic research. **Oral Oncology**, v. 47, p. 783-791, 2011.

SILVA, S.D.; FERLITO, A.; TAKES, R.P.; BRAKENHOFF, R.H.; VALENTIN, M.D.; WOOLGAR, J.A.; BRADFORD, C.R.; RODRIGO, J.P.; RINALDO, A.; HIER, M.P.H.; KOWALSKI, L.P. Advances and applications of oral cancer basic research. **Oral Oncology**, v. 47, p. 783-791, 2011.

SILVERMAN, S.; GORSKY, M.; LOZADA, F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. **Cancer**, v. 53, p. 563-568, 1984

SINACROPE, F.A.; RUAN, S.B.; CLEARY, K.R. Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 55, p. 237-241, 1995.

SONG, S.; MAZUREK, N.; LIU, C.; SUN, Y.; DING, Q.Q.; LIU, K.; HUNG, M.C.; BRESALIER, R.S. Galectin-3 mediates nuclear  $\beta$ -catenin accumulation and WNT signaling in human colon cancer cells by regulation of GSK-3 $\beta$  activity. **Cancer Research**, v. 69, p. 1343-1349, 2009.

SPARA, L.; SPARA, P.; COSTA, A.G. Epidemiological findings about oral cancer in a referral hospital evaluated during the 1980-2003 period. **Odontologia Clínica-Científica**, v. 4, p. 177-183, 2005.

STANLEY, J.S.; YORK, J.L.; BENSON, A.M. Nitroreductases and glutathione transferases that act on 4-nitroquinoline 1-oxide and their differential induction by butylated hydroxyanisole in mice. **Cancer Research**, v. 52, p. 58-63, 1992.

TADA, M.; KANAI, F.; TANAKA, Y.; TATEISHI, K.; OHTA, M.; ASAOKA, Y.; SETO, M.; MUROYAMA, R.; FUKAI, K.; IMAZEKI, F. Down-regulation of hedgehog-interacting protein through genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research**, 14, p. 3768-3776, 2008.

TAIPALE, J.; COOPER, M.K.; MAITI, T.; BEACHY, P.A. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. **Nature**, v. 418, p. 892-897, 2002.

TAKAYASU, H.; HORIE, H.; HIYAMA, E. et al. Frequent deletions and mutations of the  $\beta$ -catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibronectin and poorly differentiated histology in childhood hepatoblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 901-908, 2001.

TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; RAZ, A. Galectin-3 and metastasis. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, p. 543-549, 2004.

TANG, J.Y.; SO, P.L.; EPSTEIN, E.H. Novel Hedgehog pathway targets against basal cell carcinoma. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 224, p. 257-264, 2007.

TANG, X.H.; KNUDSEN, B.; BEMIS, D.; TICKOO, S.; GUDAS, L.J. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. **Clinical Research**, v. 10, p. 301-313, 2004.

TANIGUCHI, H.;YAMAMOTO, H.; AKUTSU, N.; NOSHO, K.; ADACHI, Y.; IMAI, K.; SHINOMURA, Y. Transcriptional silencing of hedgehog-interacting protein by CpG hypermethylation and chromatic structure in human gastrointestinal cancer. **The Journal of Pathology**, v.213, p.131–139, 2007.

TEMPE, D.; CASAS M.; KARAZ, S.; TOURNIER, M.F.B.; CONCORDET, J.P. Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3b phosphorylation leads to Gli-3 ubiquitination by SCF<sup>TrCP</sup>. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, p. 4316-4326, 2006.

THAYER, S.P.; DI MAGLIANO, M.P.; HEISER, P.W.; NIELSEN, C.M.; ROBERTS, D.J.; LAUWERS, G.Y.; QI, Y.P.; GYSIN, S.; DEL CASTILLO, C. F.; YAJNIK, V. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. **Nature**, v. 425, p.851–856, 2003.

THEUNISSEN, J.W.; SAUVAGE, F.J. Paracrine hedgehog signaling in cancer. **Cancer Research**, v.69, p.6007-6010, 2009.

VEECK, J.; WILD, P.; FUCHS, T.; SCHUFFLER, P.J.; HARTMANN, A.; RUTH, K.; DAHL. Prognostic relevance of WNT-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (Dkk3) promoter methylation in human breast cancer. **BMC Cancer**, v.9, p. 217, 2009.

VERRAS, M.; BROWN, J.; LI, X. WNT3a growth factor induces androgen receptor-mediated transcription and enhances cell growth in human prostate cancer cells. **Cancer Research**, v. 64, p.8860-8866, 2004.

XU, X.C.; EL NAGGAR, A.K.; LOTAN, R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. **The American Journal of Pathology**, v. 147, p. 815-822, 1995.

XUAN, Y.A.; JUNG, H.S.; CHOI, Y-L; SHIN, Y.K.; KIM, H.J.; KIM, K.H.; KIM, W.J.; LEE, Y.J.; KIM, S.H. Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. **Modern pathology**, v. 19, p. 1139-1174, 2006.

XUAN, Y.; LIN, Z. Expression of Indian Hedgehog signaling molecules in breast cancer. **J. Cancer Res Clin Oncol**, v. 135, p. 235-240, 2008.

WANG, Y.F.; CHANG, C.J.; LIN, C.P.; CHANG, S.Y.; CHU, P.Y.; TAI, S.K.; LI, W.Y.; CHAO, C.; CHEN, Y.J. Expression of hedgehog signaling molecules as a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. **Head and Neck**, v. 10, p. 1-7, 2012.

WATKINS, D.N.; BERMAN, D.M.; BURKHOLDER, S.G. Hedgehog signaling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. **Nature**, v. 422, p. 313-317, 2003.

WONG, G. T.; GAVIN, B.J.; MCMAHON, A.P. Differential transformation of mammary epithelial cells by WNT genes. **Molecular and Cellular Biology**, v.14, p. 6278-6286, 1994.

WU, Z.H.; GAN, L. Association of galectin-3 and E-cadherin expressions with lymph node metastasis of colon cancer. **Journal of Southern Medical University**, v.27, p. 1731-1733, 2007.

YANG, R.Y.; HSU, D.K.; LIU, F.T. Expression of galectin3 modulates Tcell growth and apoptosis. . **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** v. 93, n. 13, p. 6737- 6742, 1996.

YE, X.; ZERLANKO, B.; KENNEDY, A.; BANUMATHY, G.; ZHANG, R.; ADAMS, P. Downregulation of WNT signaling is an early signal for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. **Molecular Cell**, v. 20, p. 183-196, 2007.

YOSHIOKA,S.;KING,M.L;RAN,S.;OKUDA,H.;MACLEAN,J.A;MCASEY,M.E;SU INO,N.;BRARD,L.;WATABE,K.;HAYASHI,K. WNT7a regulates tumor growth and progression in ovarian cancer through the WNT/ $\beta$ -catenin pathway. **Molecular Cancer Research**, v. 10, p.469-482, 2012.

YU, F.; FINLEY, R.L.; RAZ, A.; KIM, H.R.C. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 15819-15827, 2002.

ZHANG, D.; CHEN, Z.G.; LIU, S.H.; DONG, Z.Q.; DALIN, M.; BAO, S.S.; HU, Y.W.; WEI, F.C. Galectin-3 gene silencing inhibits migration and invasion of human tongue cancer cells in vitro via downregulation  $\beta$ -catenin. **Acta Pharmacologica Sin**, v. 34, p. 176-184, 2012.

ZHOU, H.; KIM, S.; ISHII, S.; BOYER, T.G. Mediator modulates Gli-3 dependent Sonic Hedgehog signaling. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, p. 8667-8682, 2006.





[illegible][illegible]







## ANEXO B- Tabelas da estatística descritiva para cada anticorpo

TABELA 1 – Dados numéricos de média, mediana, máximo e mínimo em relação a expressão da proteína Wnt-3A nos grupos WT e KO.

	WT			KO		
	Média	Mediana	Máximo/Mínimo	Média	Mediana	Máximo/Mínimo
<b>DL</b>	6,279	6,625	12,0/0,0	3,377	1,500	12,0/0,0
<b>DM</b>	4,399	3,000	12,0/0,0	2,822	2,000	12,0/0,0
<b>DG</b>	5,119	4,000	12,0/0,0	4,117	2,000	12,0/0,0
<b>CA</b>	5,020	4,000	12,0/0,0	4,077	3,250	12,0/0,0

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

TABELA 2 – Dados numéricos de média, mediana, máximo e mínimo em relação a expressão da proteína Shh nos grupos WT e KO.

	WT			KO		
	Média	Mediana	Máximo/Mínimo	Média	Mediana	Máximo/Mínimo
<b>DL</b>	3,065	3,500	7,5/0	0,8470	0,0	4,0/0,0
<b>DM</b>	3,450	3,600	8,0/0,0	1,267	1,000	5,6/0,0
<b>DG</b>	3,811	4,000	8,0/1,0	1,381	1,000	4,0/0,0
<b>CA</b>	4,559	4,000	8,0/2,5	1,253	0,0	5,3/0,0

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

TABELA 3 – Dados numéricos de média, mediana, máximo e mínimo em relação a expressão da proteína Gli-3 nos grupos WT e KO.

	WT			KO		
	Média	Mediana	Máximo/Mínimo	Média	Mediana	Máximo/Mínimo
<b>DL</b>	4,546	4,000	10,0/0,0	3,473	3,000	12,0/0,0
<b>DM</b>	4,242	4,000	12,0/0,0	3,445	4,000	12,0/0,0
<b>DG</b>	3,778	4,000	12,0/0,0	4,089	4,000	12,0/0,0
<b>CA</b>	3,545	4,000	8,0/0,0	3,789	3,800	12,0/0,0

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

## ANEXO C- Tabelas mostrando a estatística descritiva do pós-teste de Dunn

Quadro 1- Resultado do pós-teste de Dunn de múltiplas comparações para a expressão da proteína Wnt-3A no grupo WT.

<b>Dunn's multiple comparisons test</b>	<b>Mean rank difference</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>
DL vs. DM	15,15	No	ns
DL vs. DG	5,988	No	ns
DL vs. CA	9,272	No	ns
DM vs. DG	-9,163	No	ns
DM vs. CA	-5,879	No	ns
DG vs. CA	3,284	No	ns

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

Quadro 2 - Resultado do pós-teste de Dunn de múltiplas comparações para a expressão da proteína Wnt-3A no grupo KO.

<b>Dunn's multiple comparisons test</b>	<b>Mean rank difference</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>
DL vs. DM	2,425	No	ns
DL vs. DG	-6,687	No	ns
DL vs. CA	-12	No	ns
DM vs. DG	-9,112	No	ns
DM vs. CA	-14,43	No	ns
DG vs. CA	-5,315	No	ns

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

Quadro 3 - Resultado do pós-teste de Dunn de múltiplas comparações para a expressão da proteína Wnt-3A.

<b>Dunn's multiple comparisons test</b>	<b>Mean rank difference</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>
WT-DL vs. KO-DL	57,47	No	ns
WT-DL vs. WT-DM	34,34	No	ns
WT-DL vs. KO-DM	61,66	No	ns
WT-DL vs. WT-DG	11,27	No	ns
WT-DL vs. KO-DG	44,59	No	ns
WT-DL vs. WT-CA	21,34	No	ns
WT-DL vs. KO-CA	38,8	No	ns
KO-DL vs. WT-DM	-23,14	No	ns
KO-DL vs. KO-DM	4,19	No	ns
KO-DL vs. WT-DG	-46,2	No	ns
KO-DL vs. KO-DG	-12,88	No	ns
KO-DL vs. WT-CA	-36,14	No	ns
KO-DL vs. KO-CA	-18,68	No	ns

WT-DM vs. KO-DM	27,33	No	ns
WT-DM vs. WT-DG	-23,07	No	ns
WT-DM vs. KO-DG	10,26	No	ns
WT-DM vs. WT-CA	-13	No	ns
WT-DM vs. KO-CA	4,461	No	ns
KO-DM vs. WT-DG	-50,39	No	ns
KO-DM vs. KO-DG	-17,07	No	ns
KO-DM vs. WT-CA	-40,33	No	ns
KO-DM vs. KO-CA	-22,87	No	ns
WT-DG vs. KO-DG	33,32	No	ns
WT-DG vs. WT-CA	10,06	No	ns
WT-DG vs. KO-CA	27,53	No	ns
KO-DG vs. WT-CA	-23,26	No	ns
KO-DG vs. KO-CA	-5,795	No	ns
WT-CA vs. KO-CA	17,46	No	ns

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

Quadro 4- Resultado do pós-teste de Dunn de múltiplas comparações sobre expressão da proteína Shh no Grupo WT.

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank difference	Significant?	Summary
DL vs. DM	-9,622	No	ns
DL vs. DG	-28,31	No	ns
DL vs. CA	-43,13	Yes	**
DM vs. DG	-18,68	No	ns
DM vs. CA	-33,51	Yes	*
DG vs. CA	-14,83	No	ns

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

Quadro 5- Resultado do pós-teste de Dunn de múltiplas comparações sobre a expressão da proteína Shh no grupo KO.

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank difference	Significant?	Summary
DL vs. DM	-16,68	No	ns
DL vs. DG	-17,49	No	ns
DL vs. CA	-8,626	No	ns
DM vs. DG	-0,8151	No	ns
DM vs. CA	8,05	No	ns
DG vs. CA	8,865	No	ns

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

Quadro 6- Resultado do pós-teste de Dunn de múltiplas comparações sobre a expressão da proteína Shh entre os grupos WT e KO.

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank difference	Significant?	Summary
WT-DL vs. KO-DL	125,6	Yes	****
WT-DL vs. WT-DM	-12,53	No	ns
WT-DL vs. KO-DM	101,6	Yes	****
WT-DL vs. WT-DG	-44,83	No	ns
WT-DL vs. KO-DG	94,43	Yes	**
WT-DL vs. WT-CA	-67,84	No	ns
WT-DL vs. KO-CA	102,9	Yes	**
KO-DL vs. WT-DM	-138,1	Yes	****
KO-DL vs. KO-DM	-24,05	No	ns
KO-DL vs. WT-DG	-170,5	Yes	****
KO-DL vs. KO-DG	-31,19	No	ns
KO-DL vs. WT-CA	-193,5	Yes	****
KO-DL vs. KO-CA	-22,74	No	ns
WT-DM vs. KO-DM	114,1	Yes	****
WT-DM vs. WT-DG	-32,31	No	ns
WT-DM vs. KO-DG	107	Yes	****
WT-DM vs. WT-CA	-55,31	No	ns
WT-DM vs. KO-CA	115,4	Yes	****
KO-DM vs. WT-DG	-146,4	Yes	****
KO-DM vs. KO-DG	-7,14	No	ns
KO-DM vs. WT-CA	-169,4	Yes	****
KO-DM vs. KO-CA	1,306	No	ns
WT-DG vs. KO-DG	139,3	Yes	****
WT-DG vs. WT-CA	-23	No	ns
WT-DG vs. KO-CA	147,7	Yes	****
KO-DG vs. WT-CA	-162,3	Yes	****
KO-DG vs. KO-CA	8,446	No	ns
WT-CA vs. KO-CA	170,7	Yes	****

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

Quadro 6- Resultado do pós-teste de Dunn de múltiplas comparações sobre a expressão da proteína Gli-3 no grupo WT.

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank difference	Significant?	Summary
DL vs. DM	10,12	No	ns
DL vs. DG	19,36	No	ns
DL vs. CA	20,81	No	ns
DM vs. DG	9,243	No	ns
DM vs. CA	10,7	No	ns



DG vs. CA	1,454	No	ns
-----------	-------	----	----

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

Quadro 7- Resultado do pós-teste de Dunn de múltiplas comparações sobre a expressão da proteína Gli-3 no grupo KO.

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank difference	Significant?	Summary
DL vs. DM	-9,59	No	ns
DL vs. DG	-19,52	No	ns
DL vs. CA	-9,853	No	ns
DM vs. DG	-9,933	No	ns
DM vs. CA	-0,2631	No	ns
DG vs. CA	9,67	No	ns

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

Quadro 6- Resultado do pós-teste de Dunn de múltiplas comparações sobre a expressão da proteína Gli-3 entre os grupos WT e KO.

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank difference	Significant?	Summary
DL-WL vs. DL-KO	69,31	No	ns
DL-WL vs. DM-WT	19,21	No	ns
DL-WL vs. DM-KO	53,67	No	ns
DL-WL vs. DG-WT	38,56	No	ns
DL-WL vs. DG-KO	35,19	No	ns
DL-WL vs. CA-WT	45,77	No	ns
DL-WL vs. CA-KO	51,14	No	ns
DL-KO vs. DM-WT	-50,1	No	ns
DL-KO vs. DM-KO	-15,64	No	ns
DL-KO vs. DG-WT	-30,75	No	ns
DL-KO vs. DG-KO	-34,12	No	ns
DL-KO vs. CA-WT	-23,54	No	ns
DL-KO vs. CA-KO	-18,17	No	ns
DM-WT vs. DM-KO	34,46	No	ns
DM-WT vs. DG-WT	19,35	No	ns
DM-WT vs. DG-KO	15,98	No	ns
DM-WT vs. CA-WT	26,56	No	ns
DM-WT vs. CA-KO	31,93	No	ns
DM-KO vs. DG-WT	-15,11	No	ns
DM-KO vs. DG-KO	-18,48	No	ns
DM-KO vs. CA-WT	-7,896	No	ns
DM-KO vs. CA-KO	-2,527	No	ns
DG-WT vs. DG-KO	-3,366	No	ns

DG-WT vs. CA-WT	7,216	No	ns
DG-WT vs. CA-KO	12,58	No	ns
DG-KO vs. CA-WT	10,58	No	ns
DG-KO vs. CA-KO	15,95	No	ns
CA-WT vs. CA-KO	5,368	No	ns

DL- Displasia Leve; DM - Displasia Moderada; DG- Displasia Grave; CA- Carcinoma.

## ANEXO D- Cópia de Aprovação do CEUA-UFU



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica -  
Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

ANÁLISE FINAL Nº 067/10 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE  
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 038/09

Projeto Pesquisa: "Estudo da Carcinogênese Bucal em Camundongos  
Knockout para Galectina - 3: Perfil da Expressão Imuno-histoquímica de Ciclina  
D1, c-Myc, B-catenina, APC e GSK - 3B".

Pesquisador Responsável: Paulo Rogério de Faria

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com  
animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO  
DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE  
ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 27 de abril de 2010

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes  
Coordenador do CEUA/UFU