

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

LEANA FERREIRA CRISPIM

**Imunolocalização de β -Catenina, GSK3 β , APC, LEF-1, e-Caderina e p63
em adenomas de células basais de glândula salivar**

UBERLÂNDIA

2014

LEANA FERREIRA CRISPIM

**Imunolocalização de β -Catenina, GSK3 β , APC, LEF-1, e-Caderina e p63
em adenomas de células basais de glândula salivar**

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. Sérgio Vitorino Cardoso

UBERLÂNDIA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C932i Crispim, Leana Ferreira, 1987-
2014 Imunolocalização de β-Catenina, GSK3β, APC, LEF-1, e-Caderina e

p63 em adenomas de células basais de glândula salivar / Leana Ferreira
Crispim. - 2014.

54 f. : il.

Orientador: Sérgio Vitorino Cardoso.

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

Inclui bibliografia.

1. Biologia - Teses. 2. Tumores - Teses. 3. Citologia - Teses.
4. Câncer - Teses. I. Cardoso, Sérgio Vitorino. II. Universidade Federal
de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 573



SERVICO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÉMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de Concentração: Biologia Celular

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número 026/2014 do PPGBC

Data: 25 de novembro de 2014

Discente: Leana Ferreira Crispim

Matrícula nº: 11222BCE002

Título do Trabalho: "Estudo imunoistoquímico da via de sinalização Wnt em adenomas de células basais de glândula salivar".

Às oito horas do dia vinte e cinco de novembro de 2014 no Anfiteatro do Bloco 4K - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Paulo Rogério de Faria /UFU; Mirta Scaloni Cordeiro /UNITRI e Sérgio Vitorino Cardoso /UFU, orientador da candidata. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso apresentou a Comissão Examinadora e a candidata Leana Ferreira Crispim; agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente ocorreu conforme as normas do Programa. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Concluída a arguição, a qual se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Leana Ferreira Crispim Aprovada.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar ficam encerrados os trabalhos às 11:20. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso
UFU

Prof. Dr. Mirta Scaloni Cordeiro
UNITRI

Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria
UFU

*Aos meus pais, minha fonte de força e inspiração;
os quais sempre batalharam para me garantir as melhores
oportunidades nessa vida...*

*À minha avó, Elvira, que sempre se fez presente em todos os
momentos e que hoje é minha grande saudade...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente, em primeiro lugar, à Deus, que me deu todas as ferramentas necessárias para estudar e batalhar pelos meus sonhos, dentre tantas outras coisas maravilhosas...

À minha mãe, Sissi, por cada gesto de afago, incentivo e broncas, sempre me orientando a trilhar bons caminhos...

Ao meu pai, Anderson, um exemplo de profissional e persistência. Agradeço pela maior herança que ganhei, os estudos...

Para eles, minha eterna e maior gratidão!

Ao meu orientador, Professor Dr Sérgio V. Cardoso, por ter me aberto as portas, por ter confiado em mim; pela paciência e pela dedicação em ensinar.... Admiro muito sua ética e profissionalismo... Muito obrigada!

Às minhas irmãs, Maíra e Samara, pelo companheirismo e amor dedicados à mim...

Ao meu namorado, por ter me apoiado em cada decisão, por ter compreendido cada ausência e por ter me dado forças para seguir em frente...

À todos meus amigos, que sempre estiveram do meu lado e que dessa vez não foi diferente...

Ao colega de laboratório, João Paulo Silva Servato, pela presteza e dedicação durante esses dois anos. Agradeço por cada conhecimento compartilhado e por ter sido um grande exemplo... Muito obrigada...

Aos colegas de laboratório, Flávia Sayuri, Gabriela Mendes, Luiz Henrique Nascimento Neto, Silas Freitas Filho, Roberta Rosa e Marília Andrade, pela convivência diária. Vou sentir muita falta de vocês, desejo que cada um conquiste coisas mais maravilhosas...

À Professora Dra Carla Siqueira, por quem tenho uma admiração infinda. Por ter me ajudado sempre. Não tenho palavras para agradecer cada momento em que tive o privilégio de conviver e aprender com você...

Aos professores, Dr Adriano Loyola e Dr Paulo Rogério de Faria, por sempre estarem disponíveis quando precisei...

À técnica Ângela Maria Pereira por ter colaborado com o meu trabalho... Obrigada!

À técnica Lúbia Cristina Fonseca, sou muito grata pela sua amizade. Com você o trabalho foi mais fácil, obrigada por cada conselho, pela preocupação e cuidado...

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas...

À Capes e à Fapemig pelo incentivo prestado durante esse tempo...

“O exemplo é uma força que repercute, de maneira imediata longe ou perto de nós... Não podemos nos responsabilizar pelo que os outros fazem de suas vidas, cada qual é livre para fazer o que quer de si mesmo, mas não podemos negar que nossas atitudes inspiram atitudes, seja no bem quanto no mal.”

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

O adenoma de células basais (ACB) é uma neoplasia glandular benigna rara que acomete principalmente a glândula salivar parótida. O conhecimento das causas e mecanismos envolvidos na patogênese do ACB são pouco compreendidas. Algumas pesquisas têm mostrado que uma característica peculiar do ACB e que o distingue dos demais tumores de glândula salivar é o acúmulo nuclear da β -Catenina, através da ativação da via de sinalização canônica Wnt. Por isso, o objetivo desse estudo foi investigar se esse acúmulo nuclear da β -Catenina em ACB se relaciona com a ativação da via de sinalização Wnt/ β -Catenina, de forma a melhor compreender a patogênese da lesão. Para isso, foram selecionados 25 casos diagnosticados como ACB. Assim, através da técnica de imunoistoquímica investigou-se a expressão de algumas das principais moléculas da via de sinalização canônica Wnt/ β -Catenina, a saber, β -Catenina, APC, GSK3 β , LEF-1 e, ainda, e-caderina e p63. Cada reação foi avaliada de forma qualitativa e quantitativa através do índice Quickscore (Detre et al., 1995). A reatividade nuclear para β -Catenina foi encontrada em 22 casos (88% da amostra), com reatividade significantemente maior nas células abluminais do que nas luminais. Ainda, verificou-se correlação estatisticamente significativa entre o Quickscore para β -Catenina e GSK3 β e p63. Tais resultados abrem novas possibilidades de investigação sobre a patogênese do ACB, ao sugerirem que GSK3 β pode ser um fator relacionado à alteração na expressão de β -Catenina, e que essa alteração pode resultar em modificação na expressão de p63.

Palavras-chave: Adenoma de células basais; Via de sinalização Wnt; β -Catenina.

ABSTRACT

Basal cell adenoma (BCA) is a rare benign salivary gland neoplasm that mainly affects the parotid salivary gland. The knowledge of the causes and mechanisms enrolled in BCA pathogenesis is poorly understood. Some research shows that a peculiar feature of the BCA that distinguishes it from other salivary gland tumors is the nuclear accumulation of β -catenin, through activation of the canonical Wnt signaling pathway. Therefore, the aim of this study was to investigate if nuclear β -catenin accumulation in BCA was been related to Wnt/ β -catenin signaling activation, and then, improve the understanding of the pathogenesis of the lesion. For this, we selected 25 cases diagnosed as BCA. So, it was investigated by immunohistochemistry the expression of some key molecules of canonical Wnt / β -catenin signaling pathway, such as APC, GSK3 β , β -Catenin, LEF-1, and e-cadherin as p63. Each reaction was analyzed qualitative and quantitatively by QuickScore index (Detre et al., 1995). The nuclear reactivity for β -catenin was found in 22 cases (88% of sample), with significantly higher reactivity in abluminal cell than in the luminal cell. We found a statistically significant correlation between QuickScore to β -catenin and GSK3 β and p63 (Pearson correlation test). These results open new possibilities for research on the pathogenesis of the BCA, when suggest that GSK3 β may be related to an alteration in the expression of β -catenin, and this change may result in a change in the expression of p63.

Key words: Basal cell adenoma; Wnt signaling pathway; β -catenin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1-** Adenoma de células basais, composto por células uniformemente basalóides, com empalhamento periférico. A célula basalóide é usualmente pequena, com citoplasma escasso, discretamente eosinófilo, com limites discretos; os núcleos ocupam grande parte da célula, são redondos a ovoides. Hematoxilina e eosina, magnificação original de 500×..... 20
- Figura 2-** Adenoma de células basais, em padrão sólido. Observa-se ilhas celulares de formas e tamanhos variáveis separadas por cordões de tecido conjuntivo denso. As células periféricas normalmente estão em paliçada. Hematoxilina e eosina. Aumento original de 500×..... 21
- Figura 3-** Adenoma de células basais, em padrão trabecular. Caracteriza-se por cordões ou trabéculas de células basalóides distintamente empalhadas na periferia, separados por estroma celularizado e vascularizado. Hematoxilina e eosina. Aumento original de 500×..... 22
- Figura 4-** Adenoma de células basais em padrão tubular. Observa-se numerosas formações ductiformes, de lúmens com diâmetros variados, células luminais e abluminais. Na fotomicrografia, as células abluminais mostram citoplasma claro, eventualmente amplo, característica que sugere diferenciação mioepitelial. Hematoxilina e eosina. Aumento original de 500×..... 23
- Figura 5-** Reatividade imunoistoquímica para β-Catenina em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade citoplasmática e nuclear, em células abluminais. Ampliação original de 450×..... 35
- Figura 6-** Reatividade imunoistoquímica para GSK3β em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade citoplasmática, em células luminais e abluminais. Ampliação original de 450×..... 37
- Figura 7-** Reatividade imunoistoquímica para APC em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade citoplasmática em células luminais. Ampliação original de 450×..... 38
- Figura 8-** Reatividade imunoistoquímica para e-Caderina em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade membranar e citoplasmática, em células luminais e abluminais. Ampliação original de 450×..... 39

Figura 9- Reatividade imunoistoquímica para LEF1 em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade nuclear em células luminais e abluminas. Ampliação original de 450×..... 40

Figura 10- Reatividade imunoistoquímica para p63 em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade nuclear em células abluminas. Ampliação original de 450×..... 41

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela I- Lista de anticorpos, clone, origem e diluição	30
Tabela II- Parâmetros e valores atribuídos à análise da imunomarcação.....	31
Gráfico 1- Comparação entre as médias (ponto central) e desvios-padrão (barras) do índice de proporção de células com reatividade nuclear para β -Catenina, segundo Detre et al. (1995), nas camadas luminal e luminal em adenomas de células basais ($p < 0,0001$; teste t)	33
Tabela III- Estudo de correlações entre a reatividade imunoistoquímica para β -Catenina e diferentes moléculas em adenomas de células basais, avaliada pelo índice Quickscore (Detre et al)	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB: Adenoma de Células Basais

APC: Adenomatous Poliposis Coli (APC)

CAC: Carcinoma Adenóide Cístico

CAMKII: Quinase II dependente de calmodulina; do inglês, *Calmodulin-dependent Kinase II*

CKI: Caseína Quinase -1; do inglês, *Casein Kinase -1*

Dkk: do inglês, *Dickkopf*

Dsh: do inglês, *Dishevelled*

FZ: do inglês, *Frizzled*

GSK3 β : Glicogênio Sintase Quinase 3 β ; do inglês, *Glycogen Synthase Kinase 3 β*

LEF: Fator Potenciador Linfóide; do inglês, *Lymphocyte Enhancer Factor*

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; do inglês, *Low-density lipoprotein*

LRP: Proteína Relacionada com o Receptor LDL; do inglês, *LDL-receptor-related protein*

NFAT: Fator Nuclear Regulador de Células T Ativadas; do inglês, *Nuclear Factor of Activated T Cell*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCP: do inglês, *Planar Cell Polarity*

PKC: Proteína Quinase C; do inglês, *Protein Kinase C*

PLC: Fosfolipase C; do inglês, *Phospholipase C*

QS: do inglês, *Quickscore*

TCF: Fator de Células T; do inglês, *T-cell Factor*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1.	Tumores de glândula salivar	18
2.2.	Adenoma de células basais.....	18
2.3.	Via de sinalização Wnt	24
2.4.	Sinalização canônica por Wnt em neoplasia	26
2.5.	Sinalização canônica por Wnt em tumores de glândulas salivares	26
2.6.	Sinalização canônica por Wnt na patogênese do ACB	28
2.7.	p63	29
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1.	Definição dos casos de interesse	31
3.2.	Imunoistoquímica	31
3.3.	Análise da imunomarcação	32
3.4.	Análise estatística	33
4.	RESULTADOS	35
5.	DISCUSSÃO.....	43
6.	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS:	47
	ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética.....	53

1. INTRODUÇÃO

O adenoma de células basais (ACB) é uma neoplasia benigna rara (ARAUJO, 2005; ISHIBASHI et al., 2012). Representa até 3% de todos os tumores de glândulas salivares e é caracterizado pela aparência basalóide das células tumorais. A maioria surge nas glândulas salivares maiores. O lobo superficial da glândula parótida é o sítio mais frequentemente acometido (aproximadamente 75%) pelo ACB, que é extremamente raro em glândulas salivares menores. A doença é tipicamente vista em adultos na sétima década de vida, com maior frequência no gênero feminino (2:1). Clinicamente, a maioria dos ACBs são solitários, nodulares, móveis e bem delimitados (ARAUJO, 2005; LONG-JIANG et al., 2008; CORDEIRO, 2010; KAWATA et al., 2010). Assim como para a maioria dos tumores epiteliais benignos das glândulas salivares, a opção terapêutica usual é a ressecção conservadora. Não é um tumor recorrente e há baixa morbidade (ARAUJO 2005; LONG-JIANG et al., 2008; CORDEIRO, 2010; KAWATA et al., 2010). As causas e mecanismos envolvidos na patogênese do ACB são pouco compreendidas (ARAUJO, 2005).

As proteínas relacionadas à via de sinalização Wnt participam em vários eventos do desenvolvimento embrionário e também tem sido relacionadas à homeostase dos tecidos adultos. Os efeitos dessa via incluem estímulos mitogênicos, de sobrevivência e de diferenciação celular. A ativação constitutiva da sinalização Wnt leva à carcinogênese e progressão tumoral em sistemas modelo e em seres humanos (POLAKIS, 2007). Grande parte dos efeitos decorrentes dessa via de sinalização dependem da proteína β -Catenina (POLAKIS, 2007; DO PRADO et al., 2007; QUEIMADO et al., 2008; HAI et al., 2010; RAO E KÜHL, 2010; LUCERO et al., 2010; KAWAHARA et al., 2011).

A β -Catenina é componente das junções aderentes, e atua na transdução de estímulos mecânicos e moleculares a partir da membrana celular até o núcleo (RAO e KÜHL, 2010). Durante o estado inativo da via Wnt/ β -Catenina, a β -Catenina é destruída no citoplasma pela via ubiquitina proteossoma (BRAUBURGER et al, 2014; SURANA et al, 2014). No entanto, na presença de ligantes Wnt, a β -catenina se estabiliza no citoplasma e, posteriormente, é translocada para o núcleo. A partir de então, forma complexo com os fatores de transcrição TCF/LEF (Fator de células T/ fator potenciador linfoide) e coativa a transcrição de genes reguladores do ciclo celular como Myc e Ciclina D1 (RAO e KÜHL, 2010; HAI et al., 2010; LUCERO et al., 2010).

Algumas pesquisas têm mostrado que o acúmulo nuclear de β -Catenina distingue o ACB dos demais tumores de glândula salivar (DO PRADO et al., 2007; KAWAHARA et al., 2011). Efeitos oncogênicos das proteínas da via de sinalização Wnt já tem sido relacionado a alguns tumores da glândula salivar, como o carcinoma adenoide cístico (CAC) (DAA et al., 2005; ZHOU e GAO, 2006), adenoma pleomórfico (FONSECA et al., 2006; GENELHU et al., 2007) e carcinoma mucoepidermóide (SHIEH et al., 2003; SHIRATSUCHI et al., 2007). Entretanto, para o ACB as informações disponíveis ainda são praticamente limitadas à compartimentalização nuclear da β -Catenina (DO PRADO et al., 2007; KAWAHARA et al., 2011). Recentemente, foi observado que a imunoreatividade para Wnt-1 parece não explicar a translocação nuclear de β -Catenina em ACB (SERVATO, 2011).

O objetivo desse estudo foi investigar se o acúmulo nuclear da β -Catenina em ACB se correlaciona com a imunoreatividade de outras moléculas associadas à via de sinalização Wnt, de forma a melhor compreender a participação dessa via na patogênese da lesão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tumores de glândula salivar

Os tumores de glândula salivar compreendem cerca de 5% das neoplasias de cabeça e pescoço (CARVALHO et al., 2005; GUNTINGAS-LICHIUS et al., 2010). Esses tumores mostram impressionante diversidade morfológica entre os diferentes tipos tumorais (ARAUJO, 2005; CHANDRASHEKAR, ANGADI e KRISHNAPILLAI, 2011) e, por vezes, dentro de uma mesma massa tumoral (ARAUJO, 2005). Além disso, esses tumores podem apresentar-se como tumores híbridos, mostrar transformação maligna e mesmo desdiferenciação (ARAUJO, 2005).

O tipo tumoral mais comum é o adenoma pleomórfico, que representa aproximadamente 50% dos casos. O tumor de Warthin é o segundo de maior frequência entre tumores benignos, seguido pelo ACB. Na maioria dos estudos, o carcinoma mucoepidermóide é o tumor maligno mais comum (EVESON et al., 2005; ELLIS e AUCLAIR, 2008).

2.2. Adenoma de células basais

O ACB é uma neoplasia benigna glandular rara, que representa até 3% de todos os tumores de glândula salivar (ARAUJO, 2005; ISHIBASHI et al., 2012). A maioria surge nas glândulas salivares maiores. O lobo superficial da parótida é o sítio mais frequentemente acometido (aproximadamente 75%), seguido pela glândula submandibular (aproximadamente 5%), sendo extremamente raro em glândulas salivares menores. São tipicamente vistos em adultos na sétima década de vida, e a maioria dos relatos mostra maior acometimento do gênero feminino (ARAUJO, 2005; ELLIS e AUCLAIR, 2008; JONES et al., 2008; TIAN et al., 2010; CORDEIRO, 2010).

Em 1972, na primeira edição do livro da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre a classificação das neoplasias de glândula salivar, os tumores benignos eram separados em apenas duas categorias: adenomas pleomorfos ou adenomas monomórficos (TCHACKRAY e SOBIN, 1972), sendo o ACB incluído nessa última categoria. Apenas a partir de 1991, na

segunda edição da mesma obra, reconheceu-se que os tumores de células basais possuíam características histológicas e prognóstico diversos, ficando nítida a importância de distingui-los dentre os tumores agrupados como adenomas monomórficos, tais como o ACB, adenocarcinoma de células basais e o carcinoma adenóide cístico (SEIFERT et al., 1990; SEIFERT et al., 1991). Na terceira edição, de 2005, a distinção foi mantida e o ACB foi melhor caracterizado com a inclusão de dados epidemiológicos, clínicos, patológicos, genéticos e imunoistoquímicos (ARAUJO, 2005).

Clinicamente, os ACBs são usualmente nódulos solitários, bem delimitados e móveis (ARAUJO, 2005; CORDEIRO, 2010), recobertos por pele ou mucosa de aspecto normal (ISHIBASHI et al., 2012). Histologicamente, o ACB mostra predominância de células uniformemente basaloides, que mostram arranjo empaliçado na interface com o estroma, conforme apresentado na Figura 1. Também podem existir células maiores, com citoplasma abundante, núcleo pálido, basofílico e alguns com um ou mais nucléolos pequenos. Na maioria dos casos também há células cuboidais que circundam pequenos lumens, sendo denominadas células luminas (ARAÚJO, 2005; ELLIS e AUCLAIR, 2008). Eventualmente as células maiores (não luminas) possuem fenótipo morfológico, imunoistoquímico e ultraestrutural que sugere tratar de células mioepiteliais (EVESON et al., 2005; ELLIS e AUCLAIR, 2008).

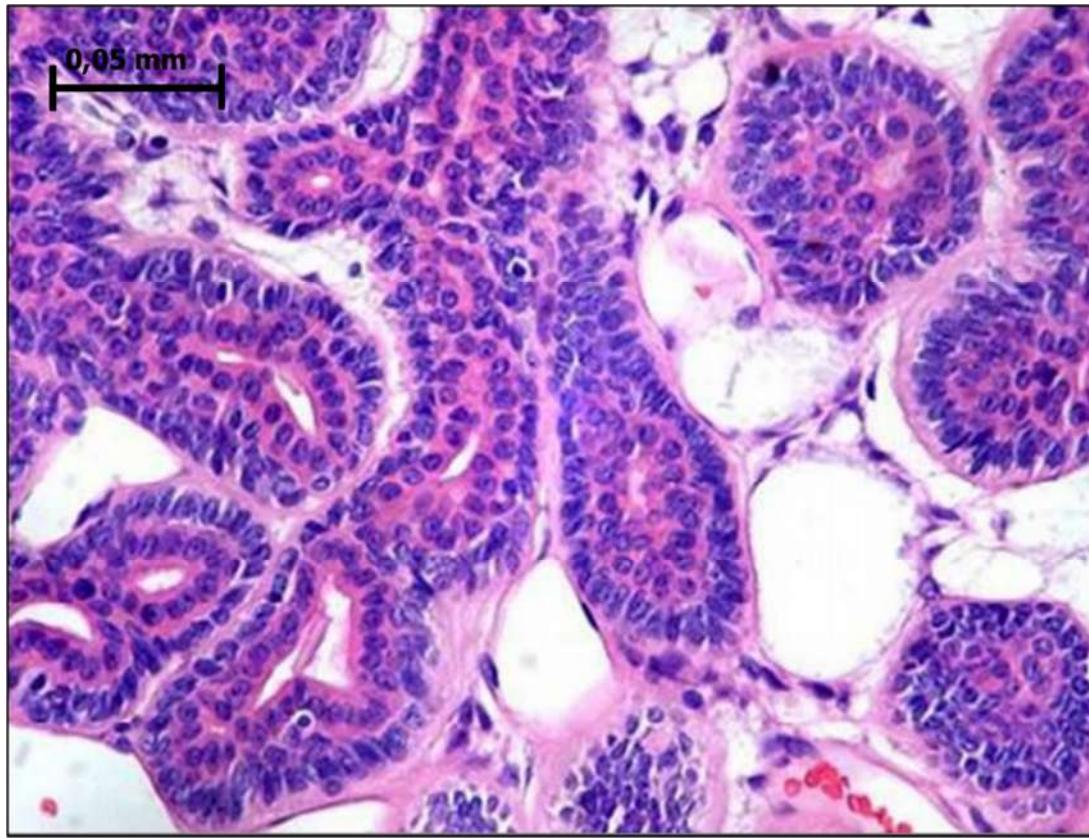


Figura 1 – Adenoma de células basais, composto por células uniformemente basalóides, com empalicamento periférico. A célula basalóide é usualmente pequena, com citoplasma escasso, discretamente eosinófilo, com limites discretos; os núcleos ocupam grande parte da célula, são redondos a ovoides. Hematoxilina e eosina, magnificação original de 500×.

O ACB pode se apresentar em padrão sólido, trabecular, tubular, ou membranoso. Tumores individuais podem possuir mais de um desses padrões, geralmente com a predominância de um deles (ARAUJO, 2005). Essa classificação não implica em comportamento biológico diferente, exceto pelo padrão membranoso que possui maior propensão a crescimento multifocal, recidivas e transformação maligna (EVESON et al., 2005; ELLIS e AUCLAIR, 2008).

O padrão sólido é usualmente relatado como o mais comum deles (ZARBO, 2002; ARAUJO, 2005; ELLIS e AUCLAIR, 2008; ISHIBASHI et al., 2012). Como ilustrado na Figura 2, é composto por lençóis ou ilhas de células com formas e tamanhos variáveis (ARAUJO, 2005). Células menores são mais numerosas, podendo ocasionar um aspecto basofílico nos agregados tumorais (ELLIS e AUCLAIR, 2008). Além disso, apresentam células periféricas

na interface com o estroma, arranjadas em paliçada (ARAUJO, 2005; ELLIS e AUCLAIR, 2008). As ilhas de células tumorais estão separadas por cordões de tecido conjuntivo denso, desorganizado (ELLIS e AUCLAIR, 2008).

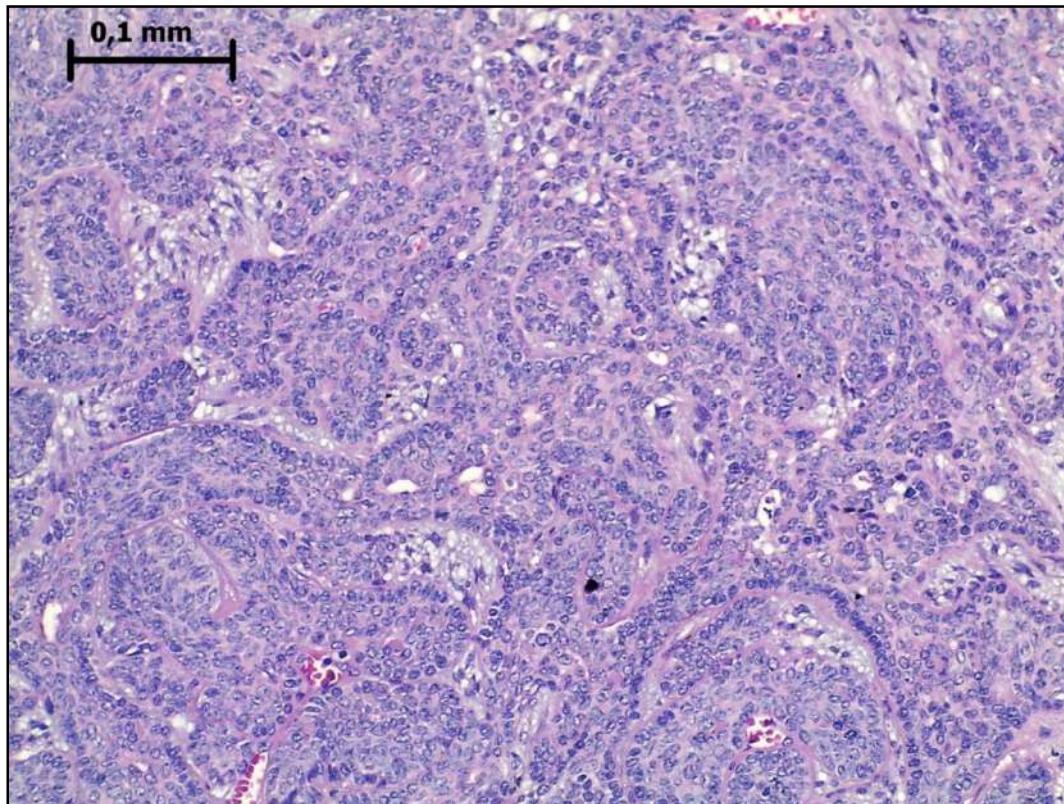


Figura 2- Adenoma de células basais em padrão sólido. Observa-se ilhas celulares de formas e tamanhos variáveis separadas por cordões de tecido conjuntivo denso. As células periféricas normalmente estão em paliçada. Hematoxilina e eosina. Aumento original de 500×.

O subtipo trabecular, apresentado na Figura 3, é caracterizado pela disposição das células neoplásicas em estruturas alongadas, sem formação exuberante de lúmens, na forma de trabéculas ou cordões de células basalóides, separadas por estroma distintamente celularizado e vascularizado, e eventualmente entrecruzados (ARAUJO, 2005).

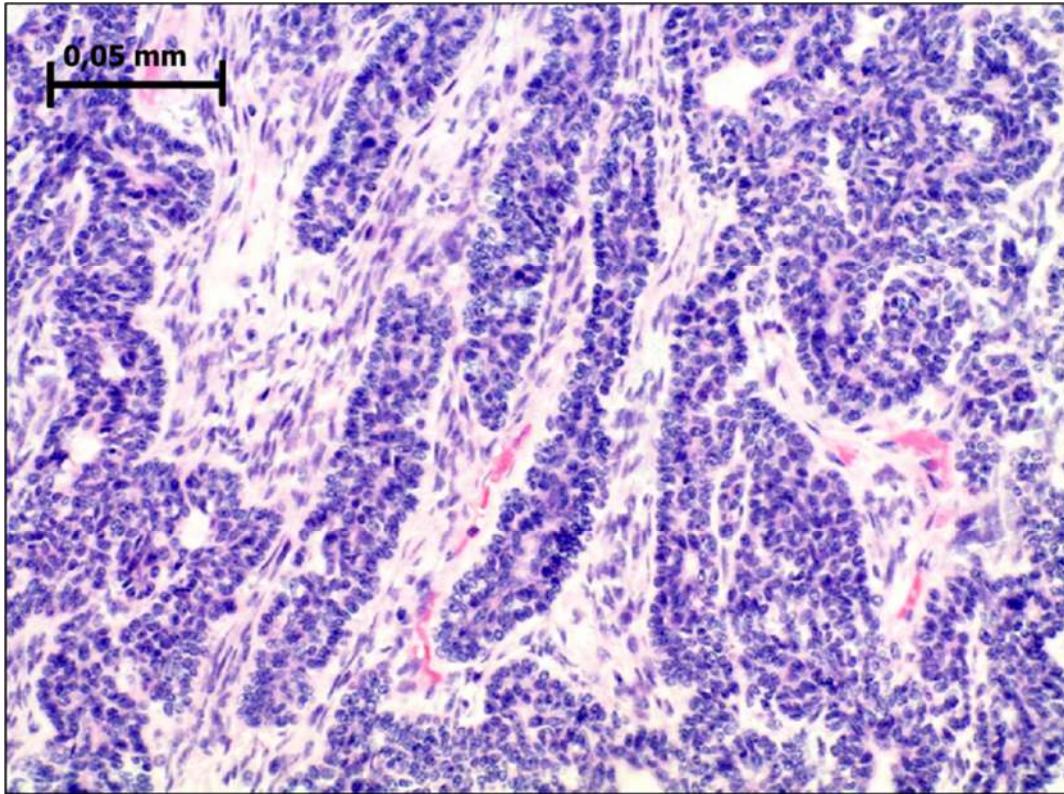


Figura 3 - Adenoma de células basais, em padrão trabecular. Caracteriza-se por cordões ou trabéculas de células basalóides distintamente empalizadas na periferia, separados por estroma celularizado e vascularizado. Hematoxilina e eosina. Aumento original de 500×.

O padrão tubular se assemelha ao trabecular por também mostrar cordões anastomosados, mas se diferencia por mostrar diferenciação ductal evidente, com numerosas formações luminais de diâmetro variado, conforme mostrado na Figura 4. Fato importante para diferenciá-lo do adenoma canalicular é a presença de uma ou várias camadas de células basalóides não luminais, periféricas (ELLIS e AUCLAIR, 2008).

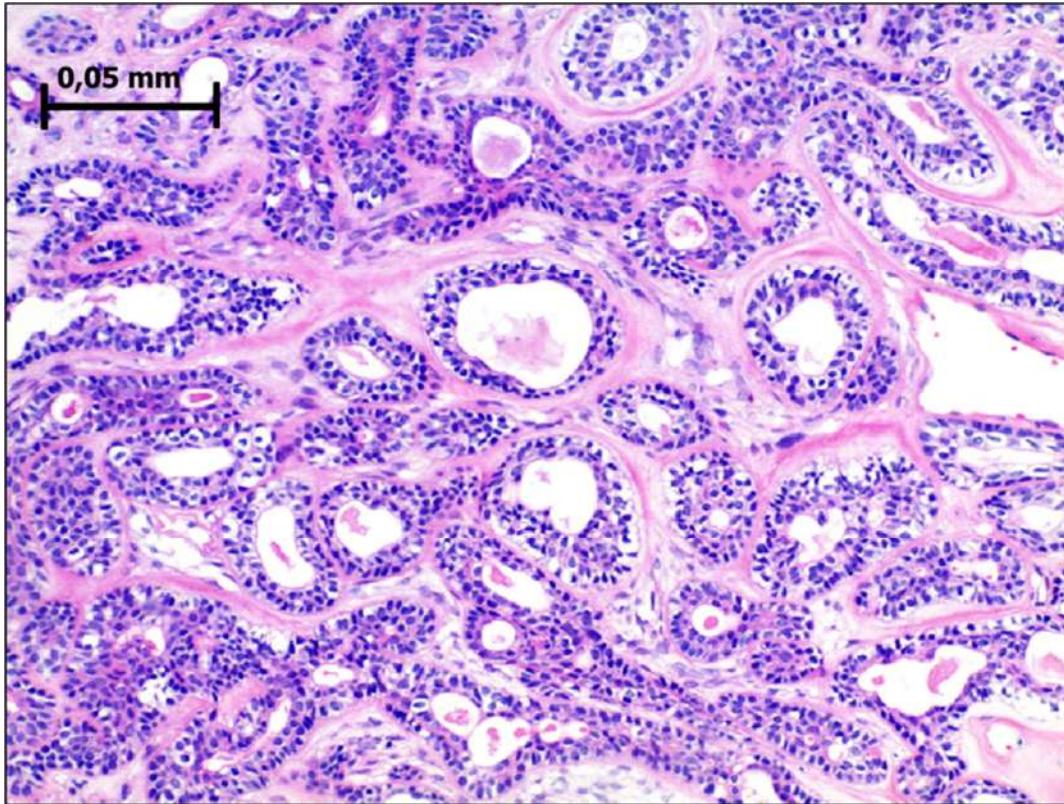


Figura 4- Adenoma de células basais em padrão tubular. Observa-se numerosas formações ductiformes, de lúmens com diâmetros variados, células luminais e abluminais. Na fotomicrografia, as células abluminais mostram citoplasma claro, eventualmente amplo, característica que sugere diferenciação mioepitelial. Hematoxilina e eosina. Aumento original de 500×.

O tipo membranoso é formado por ilhotas epiteliais densamente entrepostas. A característica distintiva desse padrão é a presença de uma camada hialina espessa, eosinofílica, ao redor dos ninhos epiteliais. Essa camada corresponde à membrana basal, e toma praticamente todo o estroma tumoral. O simples espessamento de material hialino ao redor dos agregados epiteliais não é patognomônico do subtipo membranoso, podendo ser encontrado em outras variantes, em especial na sólida (ELLIS e AUCLAIR, 2008).

O prognóstico para pacientes com ACB é bom (CORDEIRO, 2010). Recorrências não são esperadas após enucleação completa do tumor, exceto para o tipo membranoso, que recorre em aproximadamente 25% dos casos (ARAUJO, 2005). Transformação maligna é raramente descrita, de forma exclusiva para o subtipo membranoso, e ainda assim a documentação desse evento é controversa (ARAUJO 2005; ELLIS e AUCLAIR, 2008).

2.3. Via de sinalização Wnt

A via de sinalização Wnt tem papel crucial no desenvolvimento embrionário e também tem sido relacionada com a homeostase dos tecidos (KLAUSe BIRCHMEIER, 2008; ESPADA et al., 2009; HAI et al., 2010). Nos seres humanos existem 19 membros conhecidos de moléculas Wnts, as quais atuam na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. Essas moléculas são glicoproteínas, produtos proteicos dos genes WNTs, e são ricas em cisteína (GILES, VAN ES e CLEVES, 2003; MACDONALD, TAMAI e XI, 2009; RAO e KÜL, 2010; SURANA et al., 2014).

O início da transdução de sinal da via de sinalização Wnt se dá com a ligação das glicoproteínas Wnts a dois membros distintos de receptores de superfície celular: o receptor da família Frizzled (FZ) e com uma proteína correceptora relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein* – LDL), sendo por isso denominada proteína relacionada com o receptor LDL (*LDL-receptor-related protein* – LRP) (POLAKIS, 2007; LUCERO et al., 2010; RAO e KÜHL, 2010; SURANA et al., 2014). Ambas atuam como co-receptores essenciais pra a interação entre Wnt e FZ (LUSTIG e BEHRENS, 2003). Atualmente, dez receptores FZ e dois membros da família LRP, os receptores LRP-5 e 6, foram identificados em seres humanos. Os receptores FZ são compostos por um domínio amino-terminal rico em cisteína e que é responsável pela ligação às Wnts, por sete domínios transmembranares, e por uma porção carboxi-terminal voltada para a face citoplasmática da membrana celular (LUSTIG e BEHRENS, 2003).

A ligação de Wnts aos receptores de superfície celular resultam na ativação de vias de sinalização distintas: canônica (“comum”, principal) e não canônica (SURANA et al, 2014). A via canônica, também conhecida como via clássica, depende e exerce seu efeito biológico pelo bloqueio da degradação de β -Catenina. Essa degradação é resultado da fosforilação constitutiva da β -Catenina pelas proteínas Caseína-quinase 1 (CKI) e Glicogênio Sintase Quinase 3 β (GSK3 β), que por sua vez depende da formação de uma estrutura (*scaffold*) formada pelas proteínas Axina e APC (GILES, VAN ES,e CLEVES, 2003; RAO e KÜHL 2010; DAKENG et al., 2012; SURANA et al., 2014). Após fosforilada, a β -Catenina é degradada pela via ubiquitina-proteosomo (GILES, VAN ES,e CLEVES, 2003; RAO e KÜHL, 2010; DAKENG et al., 2012; BRAUBURGER et al., 2014; SURANA et al., 2014). A exclusão dos sítios de fosforilação da β -Catenina, seja por mutações pontuais ou por deleções

maiores, impede sua degradação e resulta no seu acúmulo citoplasmático e então nuclear (RAO e KÜHL, 2010).

Eventos com o mesmo resultado ocorrem na via canônica de Wnt. A ligação das proteínas Wnt ao receptor FZ na célula-alvo promove o recrutamento da proteína Dishevelled (Dsh) próximo à membrana plasmática dessa última. Concomitantemente, o ligante Wnt interage com o receptor FZ e co-receptores (LRP 5 e 6), promovendo também o recrutamento de Dsh. O acúmulo de Dsh junto à membrana plasmática sequestra a Axina, paralisando a atividade do complexo de destruição GSK3 β -CKI/Axina-APC da β -Catenina (POLAKIS, 2007; RAO e KÜHL, 2010; SURANA et al., 2014). O acúmulo de β -Catenina resulta em sua translocação para o núcleo onde, em conjunto com a família de fatores de transcrição TCF/LEF, promove a expressão de genes como c-Myc e Ciclina D1 (RAO e KÜHL, 2010; BRAUBURGER et al., 2014; SURANA et al.; 2014).

Ao contrário, fatores inibitórios da via de sinalização Wnt podem ser secretados, por exemplo, o fator inibitório de Wnt-1 (WIF-1). Esses fatores se ligam à Wnt e antagonizam a sua função (LUSTIG e BEHRENS, 2003). Outra antagonista dessa via é o Dickkopf (Dkk) que se liga ao co-receptor LRP e bloqueia sua disponibilidade (LUSTING e BEHRENS, 2003; HAI et al., 2010).

Desregulação da via de sinalização Wnt altera diversos processos fisiológicos, tais como a proliferação celular, angiogênese, senescência, morte celular e metástases, podendo resultar em carcinogênese (RAMACHANDRAN et al., 2012; ANASTAS e MOON, 2013). De fato, a alta frequência de mutações em componentes dessa via em diferentes tipos de neoplasias ressalta a sua importância durante o processo de carcinogênese (ANASTAS e MOON, 2013).

Na via de sinalização Wnt não-canônica as Wnts são capazes de iniciar a sinalização de uma forma independente de β -Catenina. Os mecanismos mais bem caracterizados da via de sinalização Wnt não canônica são dois: a “*planar cell polarity*” (PCP) ou a Wnt/ Ca $^{2+}$. A via de sinalização PCP é essencial para a regulação da polaridade celular durante a morfogênese mediada por moléculas JNK e pequenas GTPases (Rac1 e Rhoa). Essa via é ativada, na maioria das vezes, pelo ligante Wnt5a e vários estudos têm demonstrado que PCP pode antagonizar a via de sinalização canônica. Na via de Wnt/Ca $^{2+}$, a fosfolipase C (PLC) é a primeira a ser ativada, resultando na liberação de Ca $^{2+}$ intracelular, que ativará efetores subsequentes da via, Ca $^{2+}$ e quinase II dependente de calmodulina (CAMKII), calcineurina e

proteína quinase C (PKC) que, finalmente, ativa a transcrição do fator nuclear regulador de células T ativadas (NFAT), que transcreve proteínas relacionadas com a diferenciação celular (SURANA ET AL., 2014).

2.4. Sinalização canônica por Wnt em neoplasias

Em diversos tipos de câncer, incluindo carcinoma colorectal, de mama, oral e esofágico (LUCERO et al., 2010), além de adenomas adrenocortical e hepatocelular (KAWAHARA et al., 2011), a maior presença nuclear de β -Catenina em comparação com o tecido normal tem relacionado essa via de sinalização com a biologia do câncer. Outros estudos observam que a presença de β -Catenina nuclear pode prever a diminuição da sobrevida em pacientes com câncer, inclusive da mucosa oral (ISHIDA et al., 2007; LUCERO et al., 2010).

Mutações no gene codificador da β -Catenina, *CTNNB1*, foram identificadas em vários tipos de neoplasias humanas, incluindo tumores gastrointestinais, carcinoma endometrial, carcinoma hepatocelular, melanomas e tumores pancreáticos (SAEGUSA et al., 2001; ABRAHAM, et al, 2002; BREUHAHN, LONGERICH e SCHIRMACHER, 2006), bem como nos adenomas de células basais da glândula salivar (KAWAHARA et al., 2011). 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 Wnt e dos receptores FZ (SATO et al., 2007; KLAUS e BIRCHMEIER, 2008).

2.5. Sinalização canônica por Wnt em tumores de glândulas salivares

A etiologia dos tumores de glândula salivar é pouco conhecida (ARAUJO, 2005). Como mencionado anteriormente, os efeitos oncogênicos das proteínas da via de sinalização Wnt tem sido relacionado a alguns tumores da glândula salivar, como o carcinoma adenoide cístico (DAA et al., 2004; DAA et al., 2005; ZHOU e GAO, 2006), o carcinoma mucoepidermóide (SHIEH et al., 2003; SHIRATSUCHI et al., 2007), e o adenoma pleomórfico (FONSECA et al., 2006; GENELHU et al., 2007).

Há dez anos, Daa et al. (2004), investigaram possíveis mutações nos genes *CTNNB1*, AXIN e APC em uma amostra de vinte carcinomas adenóides císticos (CAC). Em 35% dos casos foram identificadas mutações em um ou mais desses três componentes. Um ano depois, Daa et al. (2005), agora em amostra de 23 CAC, avaliaram a reatividade imunoistoquímica de β -Catenina, e-caderina e Ciclina D1. Observaram que em apenas três casos a β -Catenina foi detectada no núcleo e na membrana celular. Desses três casos, em apenas um ocorreu mutação no gene *CTNNB1*. Em metade das amostras, a Ciclina D1 foi detectada no núcleo das células, mas não houve correlação com a reatividade nuclear da β -Catenina. Já em 2006, Zhou e Gao, através de análise imunoistoquímica investigaram a reatividade para β -Catenina no CAC. Em apenas 22% dos 65 casos apresentaram imunoreatividade nuclear.

Furuse et al. (2006) avaliaram a reatividade imunoistoquímica para β -Catenina em diversos tumores de glândulas salivares. Observaram aumento da reatividade nuclear nas células mioepiteliais de carcinomas epiteliais mioepiteliais. Adenomas pleomorfos, carcinomas adenóides císticos e adenocarcinomas polimorfos de baixo grau não apresentaram tal característica. Do Prado et al. (2007) observaram reatividade membranar e citoplasmática em todas as amostras avaliadas de glândulas salivares normais, adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfo.

Shieh et al. (2003) estudaram a reatividade imunoistoquímica para Caderinas e Cateninas no carcinoma mucoepidermóide. Concluíram que a reatividade aberrante para β -Catenina, em comparação com e-caderina, sugere um papel importante na diferenciação histológica e no estadiamento dos carcinomas mucoepidermóides. Em 2007, Shiratsuchi et al., investigaram anormalidades da β -Catenina e do gene APC em 44 carcinomas mucoepidermóides. Ainda, correlacionaram os padrões de superexpressão de Ciclina D1 e a acumulação nuclear/citoplasmática da β -Catenina com as condições clínicas. Os resultados mostraram que a superexpressão da Ciclina D1 foi observada em 19 casos (43,2%) e foi significativamente correlacionada com o acúmulo nuclear da β -Catenina, sugerindo que ambas possuem uma função crucial na via de sinalização Wnt.

Genelhu et al. (2007), estudaram a imunolocalização da β -Catenina em 10 amostras de adenoma pleomorfo e em 10 amostras de carcinoma ex-adenoma pleomórfico. Observaram redução da reatividade para β -Catenina na membrana celular nos tumores malignos, sugerindo que a β -Catenina pode desempenhar um papel importante na transição para o fenótipo maligno do carcinoma ex-adenoma pleomorfo. Queimado et al. (2008) observaram expressão

de Wif1 em glândulas salivares normais, com significativa redução em linhagens celulares de adenomas pleomorfos, carcinomas ex-adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos, carcinoma mucoepidermóide e carcinoma epitelial-mioepitelial. Ao contrário, não foi detectada expressão de Wnt1 no tecido normal, mas essa foi encontrada em todas as linhagens de células tumorais. Incremento de expressão de β -Catenina foi identificado nas células tumorais, havendo ainda correlação positiva entre a expressão de β -Catenina e PLAG1.

Chandrashekhar et al. (2011) avaliaram a reatividade para β -Catenina em tumores de glândulas salivares benignos e malignos para investigar a possível função dessa molécula em ambos tipos tumorais. Observaram marcação imunoistoquímica citoplasmática de β -Catenina mais frequentemente em tumores malignos do que em tumores benignos de glândulas salivares. Para esses autores, essa característica pode estar associada a falta de diferenciação, comportamento invasivo, e potencial agressivo dos tumores malignos.

2.6. Sinalização canônica por Wnt na patogênese do ACB

Em 2007, do Prado et al. descreveram pela primeira vez a localização nuclear de β -Catenina em ACBs, relacionando tal achado com uma possível explicação para o surgimento dessa doença.

Kawahara et al. (2011) descreveram o mesmo achado em 21 casos dentre 22 ACBs. Adicionalmente, relataram que 11 casos (52%) apresentavam mutações no gene *CTNNB1*, localizadas nos códons I35T e T41P. Esses mesmo autores propuseram que a frequente reatividade nuclear de β -Catenina (acima de 30%) era encontrada apenas em ACBs (quando comparado a uma amostra heterogênea de adenomas pleomorfos, tumores de Warthin, CACs, carcinomas epiteliais-mioepiteliais, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, carcinoma de ductos salivares, carcinomas mucoepidermóides, carcinomas de células acinares, e adenocarcinomas sem outra especificação), podendo ser útil como ferramenta de diagnóstico diferencial. Concluiu-se que a acumulação nuclear de β -Catenina pode estar relacionada ao desenvolvimento do ACB, sugerindo mais estudos para compreender a associação entre a via de sinalização Wnt/ β -Catenina e a tumorigênese dessa doença.

Servato (2011) confirmou a frequente reatividade imunoistoquímica para β -Catenina no núcleo de ACBs, porém verificou que essa reatividade aparentemente não se associava à reatividade imunoistoquímica para Wnt1 e c-Myc.

Pelo exposto, verifica-se que ainda é necessária investigação adicional sobre o papel da via de sinalização Wnt na patogênese do ACB. Assim, o presente estudo foi proposto com o objetivo de comparar a reatividade imunoistoquímica de APC, GSK3 β , LEF1, e-Caderina e p63, frente à de β -Catenina nesses tumores.

2.7. p63

O gene p63 está localizado no lócus 3q27-9 (TRINK et al., 1998). Assim como o gene p73, p63 foi descoberto há mais de 10 anos como membro da família de p53. Ambos exibem uma significativa homologia estrutural com p53, entretanto, não funcionam como supressores tumorais clássicos e estão raramente mutados em cânceres humanos (RIBEIRO-SILVA e ZUCOLOTO, 2003; DEYOUNG e ELLISEN, 2007).

A proteína p63 é relevante para o desenvolvimento de alguns tecidos, mas sua contribuição na tumorigênese ainda não é bem compreendida (RIBEIRO-SILVA e ZUCOLOTO, 2003; DEYOUNG e ELLISEN, 2007). É expresso de forma restrita durante o desenvolvimento. Sua expressão é detectável primeiro no ectoderma primitivo, que dá origem à epiderme, bem como nos apêndices epiteliais incluindo as glândulas sudoríparas, próstata, dentes e glândulas mamárias. Notavelmente, o p63 é essencial para o desenvolvimento da maioria dos tecidos em que é expresso, camundongos p63-null exibem profundas anormalidades de desenvolvimento da pele, membros, próstata e outros tecidos epiteliais (EDWARDS, BHUIYA e KELSCH, 2004; DEYOUNG e ELLISEN, 2007).

Esse gene marca as células basais de vários órgãos epiteliais, como a pele e a próstata, podendo ser considerado um marcador de indiferenciação celular. Sendo assim, p63 é um marcador descrito recentemente e ainda requer maior investigação para determinar seu papel no desenvolvimento de neoplasias em humanos (RIBEIRO-SILVA e ZUCOLOTO, 2003). Vários estudos reportam uma super expressão de p63 em cânceres humano, enquanto outros mostram que a perda desse mesmo gene está associada com a progressão tumoral e metástases. Assim, não se sabe se p63 é um gene supressor tumoral ou um oncogene. Essa

controvérsia tem sido atribuída à existência de múltiplas isoformas com funções distintas (INOUE e FRY, 2014). A isoforma TAp63 tem uma semelhança estrutural e funcional com p53, enquanto que Δ Np63 atua de forma contrária à p53 (EDWARDS, BHUIYA e KELSCH, 2004; INOUE e FRY, 2014).

Apesar de p63, assim como MYC, serem importantes no controlo da homeostase da epiderme, os mecanismos moleculares subjacentes que regulam a proliferação ou a diferenciação dos queratinócitos a partir destes dois genes não são completamente entendidos. Vários estudos têm fornecido informações que knockdown de p63 leva à diminuição da regulação da expressão de Myc através de vias de sinalização Wnt/ β -catenina e Notch que, por sua vez, reduz a proliferação de células epiteliais (WU et al., 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (parecer 180356/2012, anexo).

3.1. Definição dos casos de interesse

Foram selecionados 32 casos diagnosticados como ACB, por exame anatomo-patológico, no Instituto Nacional do Câncer (INCA) e na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), observados os critérios mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) (ARAUJO, 2005). Desse total de 32 casos de ACB, 7 foram excluídos devido a perda do material durante a realização da técnica de imunoistoquímica.

3.2. Imunoistoquímica

Cortes histológicos com 3 μ m de espessura, obtidos de material fixado em formalina e embebido em parafina, foram montados em lâminas silanizadas (3-aminopropiltrióxilosilano). Em seguida, foram desparafinados em xanol e hidratados em etanol acrescido de quantidades crescentes de água. Posteriormente, realizou-se remoção do pigmento formólico com hidróxido de amônio a 10% em etanol aquoso a 95%. Então, procedeu-se com a recuperação antigênica em solução de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA, 1mM) tamponado com hidróxido de sódio (pH 8,0), em câmara termopressurizada (NxGen, Biocare Medical, Concord CA, EUA). Após resfriamento das amostras e lavagem em água destilada, foi feito o bloqueio da atividade endógena de biotina e avidina, mediante banho em solução de clara de ovo e leite desnaturado (MILLER et al., 1999), e então bloqueio da atividade endógena de peroxidase com peróxido de hidrogênio a 10V, em três banhos de dez minutos cada, seguido por lavagem em água destilada.

Na etapa seguinte, os cortes foram submetidos a três banhos, de cinco minutos cada, em solução-tampão TRIS-HCl (pH 7,4). Em seguida foram incubados com cada anticorpo primário diluído em TRIS-HCl, nos títulos especificados na Tabela I, em câmara úmida por duas horas à 25°C e, posteriormente, lavadas em TRIS-HCl. Procedeu-se com a amplificação

de sinal da reação, com soluções de estreptavidina e biotina, conjugadas a peroxidase, encerrando-se com a revelação da reação com o cromógeno 3,3' tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (Starr Trek Universal HRP Detection System, Biocare Medical). Finalmente, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente, desidratadas em álcool absoluto e então montadas com lamínulas e resina histológica.

Durante todas as reações foram utilizados controles positivos para cada anticorpo, representados por fragmentos de tecidos humanos indicados pelo fabricante. Como controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos apenas pela solução de TRIS-HCl.

Tabela I- Lista de anticorpos, clone, origem e diluição

Anticorpos	Clone	Origem	Código	Diluição
β-Catenina	-	Coelho, policlonal	sc-7199	1:500
GSK3β	-	Coelho, policlonal	sc-9166	1:1500
APC	-	Coelho, policlonal	sc-896	1:500
LEF1	-	Coelho, policlonal	HPA002087	1:100
e-Caderina	-	Coelho, policlonal	HPA004812	1:50
p63	4A4	Camundongo, monoclonal	M7247	1:50

3.3. Análise da imunomarcação

A reatividade imunoistoquímica foi avaliada inicialmente de forma qualitativa quanto à presença ou não de marcação, quanto à sua compartmentalização predominante (membranar, citoplasmática e/ou nuclear), e quanto à distribuição da marcação nos diferentes padrões arquiteturais existentes em cada amostra (células luminais/abluminas).

Em seguida, foi realizada avaliação quantitativa pela metodologia do Quickscore (DETRE et al., 1995). Para tanto, conforme detalhado na Tabela II, estimou-se a quantidade de células positivas e a intensidade predominante da reatividade. Um índice, denominado “Quickscore” (DETRE et al., 1995) foi então calculado pela multiplicação entre os parâmetros intensidade e proporção de células positivas (Tabela II).

Tabela II- Parâmetros e valores atribuídos à análise da imunomarcação

Valor	Parâmetro	
	Intensidade (A)	Proporção de células positivas (B)
0	Não reativo	Não reativo
1	Fraca	0-4%
2	Moderada	5-19%
3	Forte	20-39%
4	-	40-59%
5	-	60-79%
6	-	≥ 80%
Quickscore (QS) = A x B		

Todas as análises foram realizadas com microscópio óptico Leica DM750, com objetiva de 40 vezes, por dois pesquisadores (Leana Ferreira Crispim e João Paulo Silva Servato), previamente treinados para identificar os mesmos padrões de imunomarcação celular. Em cada lâmina foram analisados dez campos consecutivos, sempre a partir de uma área de *hot spot* (regiões definidas subjetivamente como as que apresentavam maior intensidade de células positivas). Todas as análises foram realizadas individualmente, e o índice final foi a resultante da média de ambas as análises.

Ao final das análises, os valores atribuídos ao QS variaram de 0 (Negativo), 1 a 6 (Fraco), 7 a 12 (moderado) e 13 a 18 (intenso). Os valores atribuídos pelos dois pesquisadores foram considerados discrepantes quando divergiam entre negativo, fraco, moderado e intenso. Nas discrepâncias, os dois pesquisadores reanalisaram cada caso conjuntamente e redefiniram os valores de QS.

3.4. Análise estatística

Foi realizado o teste de Pearson para verificar possível correlação entre o Quickscore de APC, GSK3 β , LEF-1, e-caderina e p63 com aquele de β -Catenina. Através do teste *t* de student verificou a proporção de células abluminais e luminais reativas para β -Catenina. Todas as

análises foram executadas com o software GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para todos os testes propostos, o nível de significância estatística foi estabelecido em 5%.

4. RESULTADOS

Nesse estudo, o padrão histológico predominante nos casos selecionados foi o trabecular (52%), seguido do sólido (32%) e do tubular (16%).

Reatividade nuclear para β -Catenina foi encontrada em 22 casos (88% da amostra). Conforme ilustrado na Figura 5 e detalhado no Gráfico 1, a proporção de células reativas foi significativamente maior nas células abluminais que luminais (índices médios de 3,2 e 0,7, respectivamente; $p < 0,0001$, teste t).

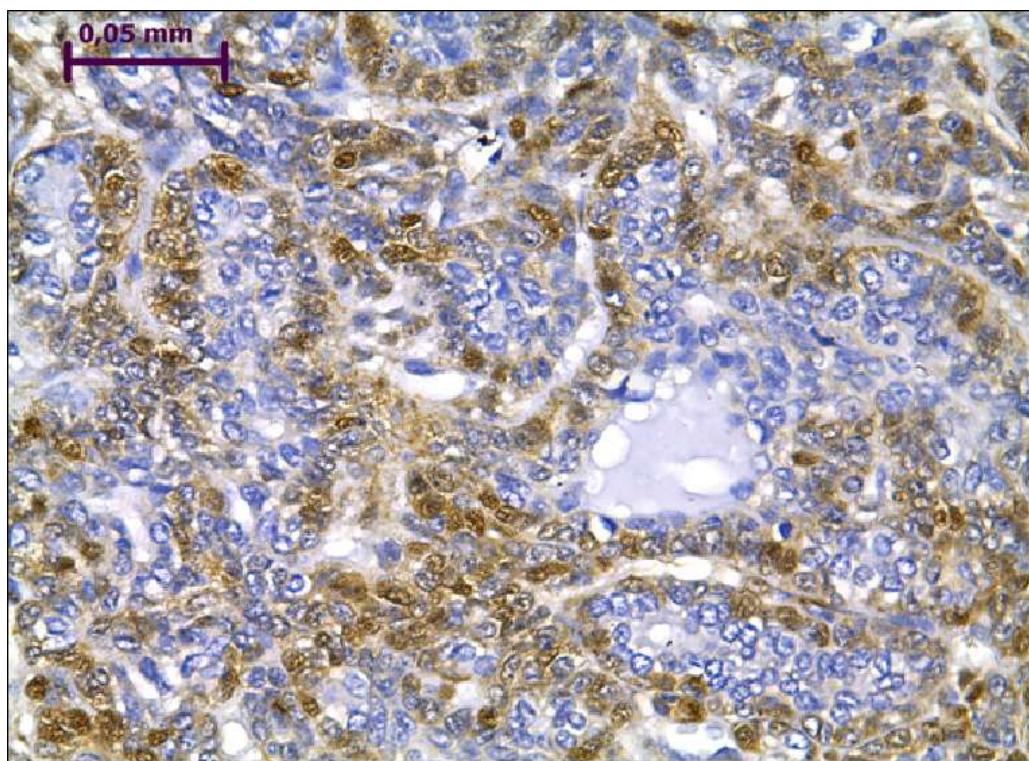


Figura 5- Reatividade imunoistoquímica para β -Catenina em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade citoplasmática e nuclear em células abluminais. Técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Ampliação original de 450 \times .

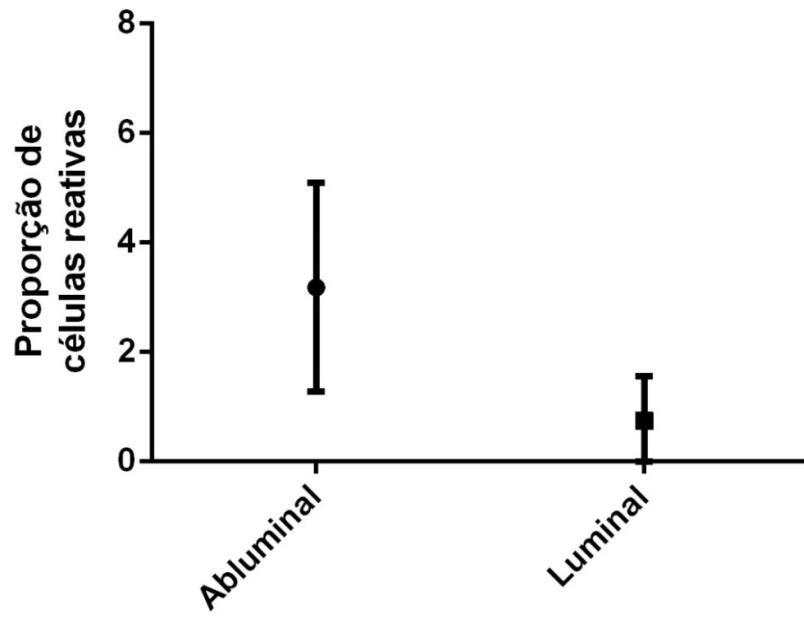


Gráfico 2- Comparação entre as médias (ponto central) e desvios-padrão (barras) do índice de proporção de células com reatividade nuclear para β -Catenina, segundo Detre et al. (1995), nas camadas abluminal e luminal em adenomas de células basais ($p < 0,0001$; teste t)

Reatividade para GSK3 β , como ilustrado na Figura 6, foi identificada em 80% dos casos, em padrão citoplasmático de fraca a moderada intensidade. Não se evidenciou diferença evidente na proporção de reatividade entre células luminais e abluminais.

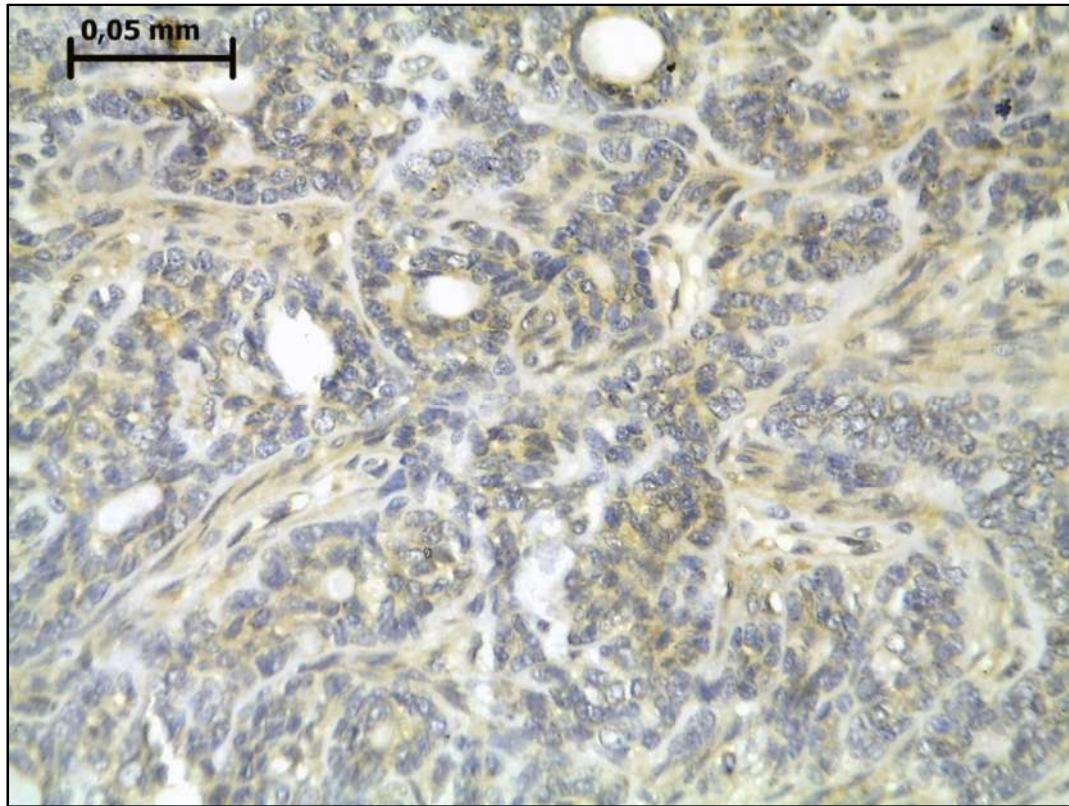


Figura 6- Reatividade imunoistoquímica para GSK3 β em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade citoplasmática em células luminais e abluminais. Técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase.. Ampliação original de 450 \times .

Reatividade citoplasmática para APC, exemplificada na Figura 7, foi observada em 44% dos casos, restrita às células luminais e de fraca intensidade.

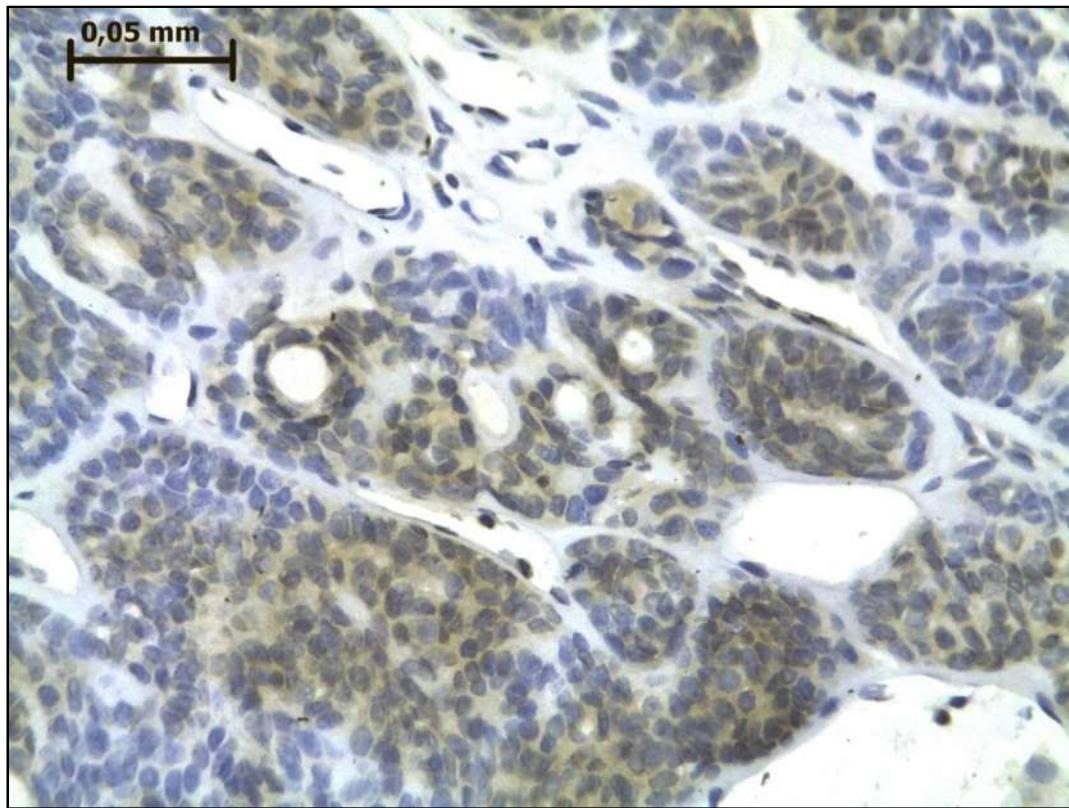


Figura 7- Reatividade imunoistoquímica para APC em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade citoplasmática em células luminais.. Técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Ampliação original de 450×.

Quanto à reatividade para e-Caderina, esta foi observada em membrana e, ou, citoplasma, de fraca intensidade, em células luminais e abluminais, em 80% dos casos, conforme exemplificado na Figura 8.

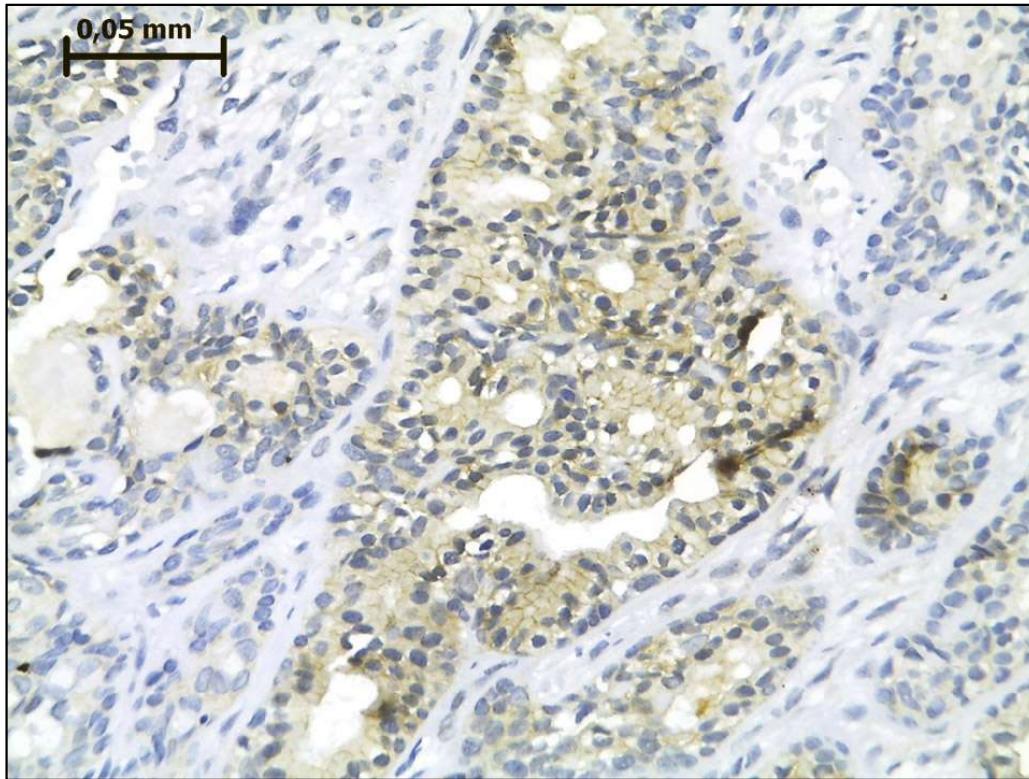


Figura 8- Reatividade imunoistoquímica para e-Caderina em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade membranar e citoplasmática em células luminais e abluminais. Técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Ampliação original de 450 \times .

Reatividade para LEF-1 foi identificada em 16% dos casos, como marcação nuclear tanto em células luminais quanto abluminais, na forma mostrada na Figura 9.

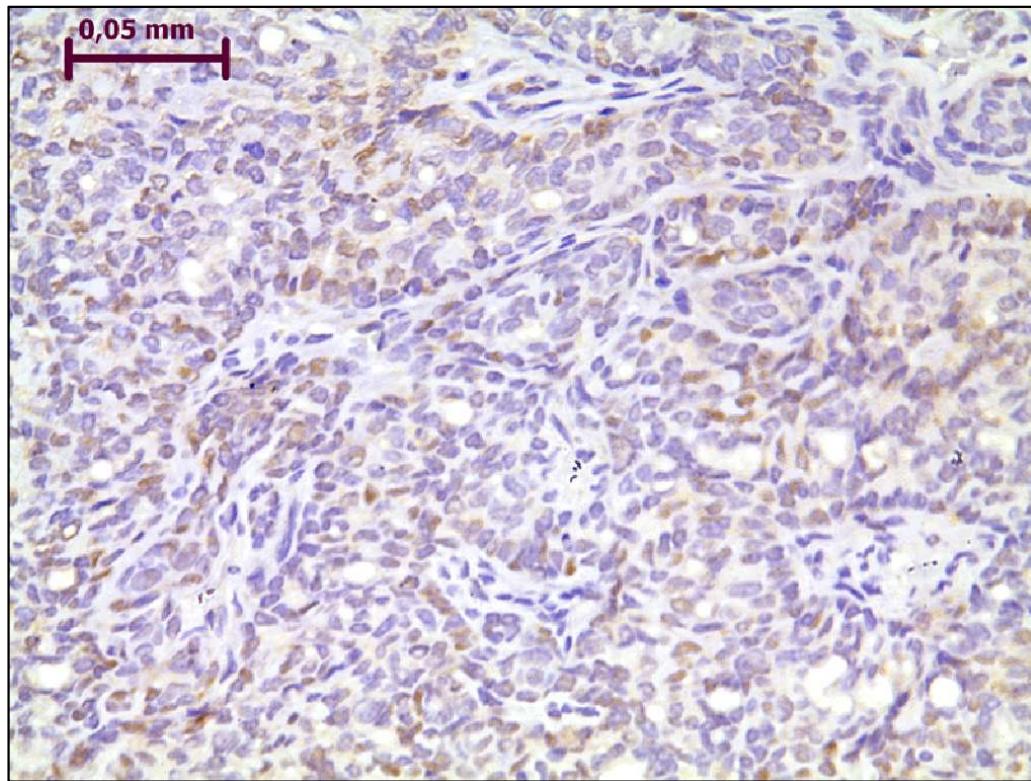


Figura 9- Reatividade imunoistoquímica para LEF1 em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade nuclear em células luminais e abluminas. Técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Ampliação original de 450 \times .

Finalmente, para p63, reatividade foi verificada em 88% dos casos, em padrão nuclear e em células abluminas, conforme ilustrado na Figura 10.

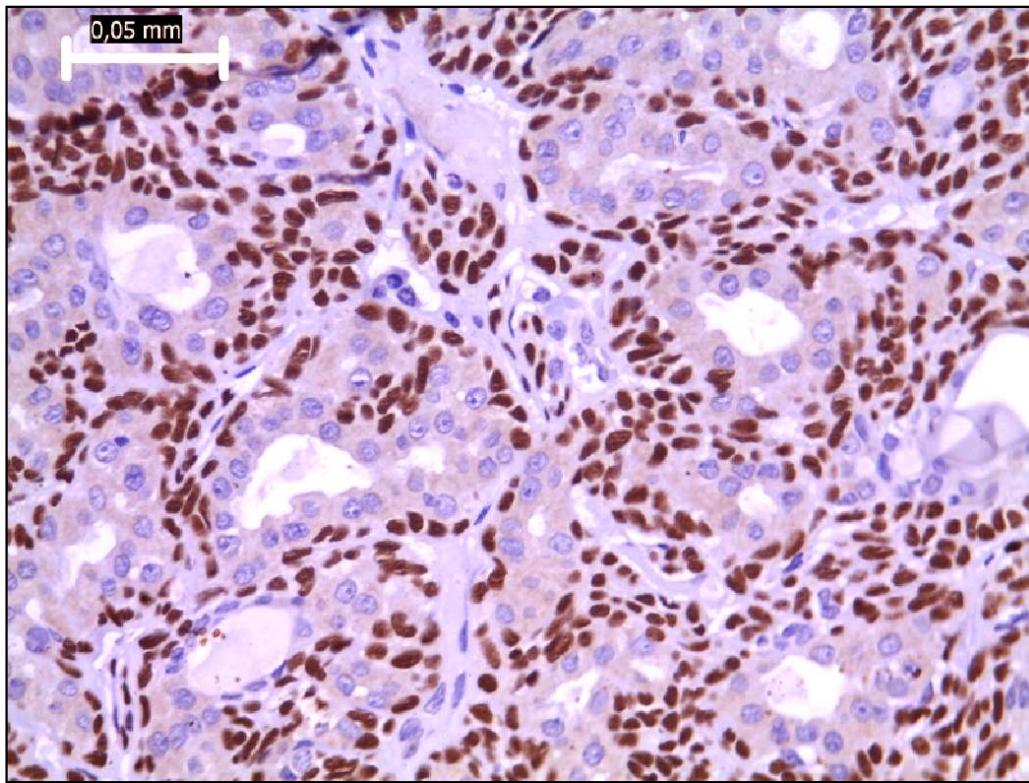


Figura 10- Reatividade imunoistoquímica para p63 em adenoma de células basais de glândula salivar. Há reatividade nuclear em células abluminais. Técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Ampliação original de 450×.

Verificou-se correlação estatisticamente significativa entre o QS para β -Catenina e GSK3 β e p63, conforme descrito na Tabela III.

Tabela III- Estudo de correlações entre a reatividade imunoistoquímica para β -Catenina e diferentes moléculas em adenomas de células basais, avaliada pelo índice Quickscore (Detre et al)

Molécula	Frequência de reatividade	QS médio (\pm DP)	<i>Correlação com β-Catenina*</i>	
			<i>r</i>	<i>p</i>
β -Catenina	88%	5,8 (4,7)	-	-
GSK3β	80%	5,0 (4,7)	0,50	0,02
APC	44%	1,1 (1,8)	-0,24	0,27
LEF1	16%	0,7 (1,6)	0,28	0,17
e-Caderina	80%	2,5 (2,6)	-0,08	0,78
p63	88%	9,3 (5,2)	0,42	0,04

* Teste de correlação de Pearson.

5. DISCUSSÃO

Este estudo foi proposto devido às descrições anteriores de que a expressão nuclear da β -Catenina é frequentemente encontrada nos adenomas de células basais (KAWAHARA et al., 2011; DO PRADO et al., 2007; FURUSE et al., 2006). Trabalhou-se com a hipótese de confirmar tal informação. Isso de fato ocorreu, frente à reatividade nuclear para β -Catenina em 88% dos casos.

Kawahara et al. (2011) sugeriram que o acúmulo nuclear da β -Catenina poderia estar relacionada com diferenciação mioepitelial. De fato, no presente estudo observou-se que a reatividade para β -Catenina é mais frequente nas células abluminais, justamente as células que parecem exibir diferenciação mioepitelial (ZARBO, 2002).

Kawahara et al. (2011) também verificaram que o acúmulo nuclear de β -Catenina pode ser coincidente com mutações no gene que codifica a β -Catenina, *CTNNB1*. No entanto, essas mutações foram observadas apenas em aproximadamente metade dos casos. Também não está suficientemente claro se a mutação mais frequente (translocação no resíduo I35) levaria à estabilização da β -Catenina, por impedir seu reconhecimento e degradação ou até mesmo por provocar uma perda ou ganho de função. Por isso, fez-se relevante investigar outras possíveis causas para o acúmulo nuclear de β -Catenina.

Em pelo menos três casos ocorre o acúmulo da forma hipo-fosforilada, estável, de β -Catenina, com localização nuclear: 1 - Ativação da via Wnt canônica, quando a interação de ligantes (por exemplo, Wnt1) com receptores e co-receptores de membrana (FZ e LRP respectivamente) bloqueiam a degradação da β -Catenina. 2 - Mutação inativadora nos resíduos N-terminal do gene *CTNNB1*, a qual impossibilitaria a degradação da proteína por proteossoma (RAO e KÜLH, 2010; LUCERO et al., 2010). 3 - Mutação inativadora ou silenciamento epigenético em genes relacionados com o complexo de destruição citoplasmático da β -Catenina, tais como APC ou GSK3 β (SATO et al., 2007; KLAUS e BIRCHMEIER, 2008). Não foi identificada na literatura trabalhos investigando se a via de sinalização Wnt/ β -Catenina está relacionada com a patogênese do ACB.

Estudos mostram que a regulação aberrante de GSK3 β tem sido implicada em uma variedade de doenças humanas, incluindo diabetes mellitus não insulino-dependente, doença cardiovascular, doenças neurodegenerativas (LUO J, 2009) e neoplásicas. O papel de GSK3 β

na tumorigênese e progressão tumoral permanece controversa, podendo funcionar como “supressor tumoral” para alguns tumores e promover o crescimento e desenvolvimento de outros (SHAKOORI et al., 2005; LUO J, 2009). Sabe-se que essa molécula é um dos componentes do complexo de destruição da β -Catenina (DAKENG et al., 2012; SURANA et al., 2014), e tem a capacidade de marcá-la para degradação evitando que não ocorra sua estabilização citoplasmática e consequente translocação para o núcleo (DAKENG et al., 2012; BRAUBURGER et al., 2014; SURANA et al., 2014). Nesse estudo foi observada correlação positiva e estatisticamente significante entre o QS de β -Catenina e GSK3 β . Tal fato pode refletir um mecanismo frustrado de retroalimentação, em que o aumento de expressão de GSK3 β seria uma tentativa de bloquear a atividade excessiva de β -Catenina. Ou seja, seria uma tentativa mal sucedida de atuação como “supressora tumoral”, mediante bloqueio da translocação da β -Catenina para o núcleo.

Não foi identificada correlação entre a reatividade para β -Catenina e APC, o que sugere que a expressão dessa última não seja relevante como causa da translocação nuclear da primeira nos adenomas de células basais de glândula salivar.

Outra forma de indução da translocação nuclear de β -Catenina é a disfunção de e-Caderina. Essa é uma molécula que faz parte dos complexos de adesão celular, e para tanto se ligam ao citoesqueleto de forma mediada pelas Cateninas. Em situação fisiológica, e-Caderina e β -Catenina são vistas junto à membrana plasmática. Ruptura dessa interação molecular resulta na migração nuclear da última. Furuse et al. (2006) verificaram tal fenômeno em carcinomas epiteliais-mioepiteliais de glândula salivar, mas não em adenomas pleomórficos e carcinomas adenoides císticos. Embora a translocação nuclear de β -Catenina tenha sido um fenômeno evidente no presente estudo, não houve alteração aparente na presença de e-Caderina na membrana das células neoplásicas. Também não se identificou qualquer correlação significativa na reatividade dessas duas moléculas.

Se o acúmulo nuclear da β -Catenina pode acontecer por diferentes vias; os efeitos dessa alteração também são variados e difíceis de determinar com precisão. A β -Catenina, quando translocada para o núcleo, juntamente com TCF/LEF coativa a transcrição de genes envolvidos em diversos processos celulares, tais como a apoptose, progressão do ciclo celular, crescimento celular e a replicação do DNA (MAO e BYERS, 2011; BRAUBURGER et al, 2014; SURANA et al.; 2014). CCND1 codifica a proteína Ciclina D1, e é um dos genes envolvidos na via de sinalização Wnt/ β -Catenina, mas há evidências de que a expressão de

Ciclina D1 é independente da acumulação nuclear de β -Catenina nos tumores de glândulas salivares (DAA et al., 2004; POLAKIS, 2007; RAO e KÜHL, 2010; LUCERO et al., 2010; MYANT e SANSOM, 2011). Myc é outro gene sob o controle da β -Catenina; é um fator de transcrição que regula a expressão de até 15% dos genes humanos e parece ser importante na patogênese do câncer em humanos, notavelmente no câncer colo-rectal, pulmão e pâncreas, em que a super expressão de c-Myc poderia ser conduzido por uma amplificação da sinalização Wnt/ β -Catenina (MYANT e SANSOM, 2011). Todavia, estudo anterior mostrou que o acúmulo nuclear de β -Catenina no ACB parece não estar relacionado à maior expressão de Myc (SERVATO, 2011).

No presente estudo, verificou-se reatividade frequente e intensa para p63, especialmente em células abluminais. Esse mesmo padrão já havia sido relatado em estudo anterior (JUNG et al., 2013), que relacionou esse evento à diferenciação mioepitelial. De forma interessante, foram verificadas agora a coincidência de localização (em células abluminais) e correlação positiva e significativa entre a reatividade para β -Catenina e p63. Recentemente, foi verificado em carcinomas epidermóide de esôfago que a superexpressão da última aumenta a expressão da primeira, fenômeno que foi associado a comportamento invasivo (LEE et al., 2014). Por outro lado, efeito inibitório na expressão de β -Catenina já foi observado após silenciamento da isoforma Δ Np63 (WARNER et al., 2013). Relacionamento entre a expressão de β -Catenina e p63 tem sido observada em outros trabalhos (DREWELUS et al., 2010; ZHANG et al., 2010; EBRAHIMI et al., 2008).

6. CONCLUSÃO

Sabendo-se que os tumores de glândula salivar, especialmente os ACBs, são incomuns, os estudos sobre os eventos moleculares que participam no seu desenvolvimento são bastante limitados. Os resultados deste estudo abrem novas possibilidades de investigação, ao sugerirem que GSK3 β pode ser um fator relacionado à alteração na expressão de β -Catenina, e que essa alteração pode resultar em modificação na expressão de p63. Todavia, tais resultados não são suficientes para sustentar uma ativação da via Wnt no adenoma de células basais de glândula salivar, bem como para compreender definitivamente o motivo pelo qual a β -Catenina não é degradada no citoplasma e translocada para o núcleo.

REFERÊNCIAS:

- 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-pseudo papillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinoma and almost always harbor β -catenina mutations. **American Journal of Pathology**, v.160, n. 4, p. 1361-1369, April 2002.
- ANASTAS, J.N.; MOON, R.T. WNT signaling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nature Reviews**, v.13, n.1, p.11-24, January 2013.
- ARAUJO, VC. Basal cell adenoma. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, et al. World health organization classification of tumours. **Pathology and genetics of head and neck tumours**. Geneva: IARC Press, 2005; p261-2.
- BARNES, L.; EVESON, J.; REICHART, P. et al. **World health organization classification of tumours pathology and genetics of head and neck tumours**. Geneva: IARC Press, 2005
- BRAUBURGER, K.; AKYILDIZ, S.; RUPPERT, J.G.; GRAEB, M.; BERNKOPF, D.B.; HADJIHANNAS, M.V., BEHRENS, J. Adenomatous polyposis coli (APC) membrane recruitment 3, a member of the APC membrane recruitment family of APC-binding proteins, is a positive regulator of Wnt- β -catenin signalling. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 3, p. 787-801, February 2014.
- BREUHAHN, K.; LONGERICH, T.; SCHIRMACHER, P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 25, p. 3787-3800, June 2006.
- CARVALHO, A.L.; NISHIMOTO, I.N.; CALIFANO, J.A.; KOWALSKI, L.P. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site specific analysis of the SEER database. **Internacional Journal of Cancer**, v. 114, n. 5, p. 806-816, May 2005.
- CHANDRASHEKAR, C.; ANGADI, P.V.; KRISHNAPILLAI, R. β -Catenina expression in benign and malignant salivary gland tumors. **Internacional Journal of Surgical Pathology**, v. 19, n. 4, p. 433-440, August 2011.
- CORDEIRO, M. S. **Adenoma de células basais no Instituto Nacional do Câncer: experiência com 30 casos**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Uberlândia. 2010, 78f.
- DAA, T.; KAKU, N.; KASHIMA, K.; NAKAYAMA, I.; YOKOYAMA, S. Expression of β -catenina, E-cadherin and cyclin D1 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 1, p. 83-87, March 2005.
- DAA, T.; KASHIMA, K.; KAKU, N.; SUZUKI, M.; YOKOYAMA, S. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in adenoid cystic carcinoma. **Modern Pathology**, v. 17, n. 12, December 2004.

DAKENG, S.; DUANGMANO, S.; JIRATCHARIYAKUL, W.; U-PRATYA, Y.; BÖGLER, O.; 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 β -catenina to the nucleus. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 1, p. 49-60, January 2013.

DETRE, S.; SACLANIOTTI, G.; DOWSETT, M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 48, n. 9, p. 876-878, September 1995.

DEYOUNG, M.P.; ELLISEN, L.W. p63 and p73 in human cancer: defining the network. **Oncogene**, v. 26, p. 5169-5183, August 2007.

DO PRADO, R.F.; CARDOSO, C.L.; CONSOLARO, A.; DE ASSIS TAVEIRA, L.A. Nuclear β -catenina in basal cell adenomas. **Internacional Journal of Surgical Pathology**, v. 15, n. 2, p. 219-220, April 2007.

DREWELUS I.; GÖPFERT C.; HIPPEL C.; DICKMANNS A.; DAMIANITSCH K.; PIELER T.; DOBBELSTEIN M. p63 antagonizes Wnt-induced transcription. **Cell Cycle**, v. 9, n. 3, p. 580-587, February 2010.

EBRAHIMI M.; BOLDRUP L.; WAHLIN YB.; COATES PJ.; NYLANDER K. Decreased expression of the p63 related proteins beta-catenin, E-cadherin and EGFR in oral lichen planus. **Oral Oncology**, v. 44, n. 7, p. 634-638, July 2008.

EDWARDS PC.; BHUIYA T.; KELSCH RD. Assessment of p63 expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and basal cell and canalicular adenomas. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 97, n. 5, p. 613-619, May 2004.

ELLIS, G.L.; AUCLAIR, P.L. **Tumors of the salivary glands**. AFIP atlas of tumor pathology, 4th series, fascicle 9. Silver Spring MD: ARP Press; 2008.

ESPADA, J.; CALVO, M.B.; DÍAZ-PRADO, S.; MEDINA, V. Wnt signalling and cancer stem cells. **Clinical & Translational Oncology**, v. 11, n. 7, p. 411-427, July 2009.

EVESON, J.W.; AUCLAIR, P.; GNEPP, D.R.; EL-NAGGAR, A.K. Tumors of salivary gland: Introduction. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, et al. **World health organization classification of tumours**. Pathology and genetics of head and neck tumours. Geneva: IARC Press, 2005. p. 212-5.

FONSECA, I.; FONSECA, R.; MARTINS, C.; SOARES, J. Alteration of β -Catenin localization in salivary pleomorphic adenomas is not related to t (3;8) (p21; q12) and is mainly present in non-epithelial cell types. **Histopathology**, v. 52, n. 2, p. 244-247, January 2008.

FURUSE, C.; CURY, P.R.; ALTEMANI, A.; DOS SANTOS PINTO D.JR.; DE ARAÚJO, N.S.; DE ARAÚJO, V.C. β -catenin and E-cadherin expression in salivary gland tumors. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 14, n. 3, p. 212-217, July 2006.

GENELHU, M.C.; GOBBI, H.; ARANTES, D.C.; CARDOSO, S.V.; CASSALI, G.D. Immunolocalization of β -catenina in pleomorphic adenomas and carcinomas ex-pleomorphic adenomas of salivary glands. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 15, n. 3, p. 273-278, September 2007.

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

GUNTINAS-LICHIUS, O.; WENDT, T.; BUENTZEL, J.; ESSER, D.; LOCHNER, P.; MUELLER, A.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; ALTENDORF-HOFMANN, A. Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian cancer registration database. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, v. 136, n. 1, p. 55-63, January 2010.

HAI, B.; YANG, Z.; MILLAR, S.E.; CHOI, Y.S.; TAKETO, M.M.; NAGY, A. et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates post natal development and regeneration of the salivary gland. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 11, p. 1793-1801, November 2010.

INOUE K.; FRY EA. Alterations of p63 and p73 in Human Cancers. **Sub-cellular Biochemistry**, v. 85, p. 17-40, July 2014.

ISHIBASHI, N.; YANAGAWA, T.; YAMAGATA, K.; KARUB, R.; SHINOZUKA, K.; NAGATA, C.; NOGUCHI, M.; ONIZAWA, K.; BUKAWA, H. Basal cell adenoma arising in a minor salivary gland of the palate. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 16, n. 1, p. 111-114, March 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 leukoplasia. **Molecular Cancer**, v. 62, p. 1-7, October 2007.

JONES, A.V.; CRAIG, G.T.; SPEIGHT, P.M.; FRANKLIN, C.D. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. **Oral Oncology**, v. 44, n. 4, p. 407-417, April 2008.

JUNG, M.J.; ROH, J.L.; CHOI, S.H.; NAM, S.Y.; KIM, S.Y.; LEE, S.W.; CHO, K.J. Basal cell adenocarcinoma of the salivary gland: A morphological and immunohistochemical comparison with basal cell adenoma with and without capsular invasion. **Diagnostic Pathology**, v. 171, p. 1-8, October 2013.

KAWAHARA, A.; HARADA, H.; ABE, H.; YAMAGUCHI, T.; TAIRA, T.; NAKASHIMA, K.; MIHASHI, H.; AKIBA, J.; KAGE, M. Nuclear β -catenin expression in basal cell

adenomas of salivary gland. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 40, n. 6, p. 460-466, July 2011.

KAWATA, R.; YOSHIMURA, K.; LEE, K.; ARAKI, M.; TAKENAKA, H.; TSUJI, M. Basal cell adenoma of the parotid gland: a clinicopathological study of nine cases -basal cell adenoma versus pleomorphic adenoma and Warthin's tumor. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 265, n. 5, p. 779-783, May 2010.

KLAUS, A; BIRCHMEIER, W. WNT signaling and its impact on development and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 5, p. 387-398, May 2008.

LEE, K.B.; YE, S.; PARK, M.H.; PARK, B.H.; LEE, J.S.; KIM, S.M. p63-Mediated activation of the β -catenin/c-Myc signaling pathway stimulates esophageal squamous carcinoma cell invasion and metastasis. **Cancer Letters**, v. 353, n. 1, p. 124-132, October 2014.

LONG-JIANG, L.; YI, L.; YU-MING, W.; HUA, L.; HONG-WEI, Z. Clinical analysis of salivary gland tumor cases in West China in past 50 years. **Oral Oncology**, v. 44, n. 2, p. 187-192, February 2008.

LUCERO, O.M.; DAWSON, D.W.; MOON, R.T.; CHIEN, A.J. A re-evaluation of the "oncogenic" nature of Wnt/beta-catenin signaling in melanoma and other cancers. **Current Oncology Reports**, v. 12, n. 5, p. 314-318, September 2010.

LUO J. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. **Cancer Letters**, v. 273, n. 2, p. 194-200, January 2009.

LUSTIG, B.; BEHRENS, J. The WNT signaling pathway and its role in tumor development. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 129, n. 4, p. 199-221, April 2003.

MACDONALD, B.T.; TAMAI, K.; XI, H.E. WNT/B-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Development Cell**, v.17, n. 1, p. 9-26, July 2009.

MAO CD.; BYERS SW. Cell-context dependent TCF/LEF expression and function: alternative tales of repression, de-repression and activation potentials. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 21, n. 3, p. 207-236, 2011.

MILLER, R.; KUBIER, P.; REYNOLDS, B.; HENRY, T.; TURNBOW, H. Blocking of endogenous avidin-binding activity in immunohistochemistry. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 7, n. 1, p. 63-65, March 1999.

MYANT, K.; SANSOM, O.J. Wnt/Myc interactions in intestinal cancer: Partners in crime. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 19, p. 2725-2731, November 2011.

POLAKIS, P. The many ways of Wnt in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 17, n. 1, p. 45-51, February 2007.

QUEIMADO, L.; OBESO, D.; HATFIELD, M.D.; YANG, Y.; HOMPSON, D.M.; REIS, A.M. Dysregulation of Wnt pathway components in human salivary gland tumors. **Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery**, v. 134, n. 1, p. 94-101, January 2008.

RAMACHANDRAN, I.; THAVATHIRU, E.; RAMALINGAM, S.; NATARAJAN, G.; MILLS, W.K.; BENBROOK, D.M.; ZUNA, R.; LIGHFOOT, S.; REIS, A.; ANANT, S.; QUEIMADO, L. WNT inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis. **Oncogene**, v. 31, n. 22, p. 2725-2737, May 2012.

RAO, T.P.; KÜHL, M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. **Circulation Research**, v. 106, n. 12, p. 1798-1806, June 2010.

RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. The p53 family: structural and functional aspects of p73 and p63. **Journal Brazilian of Pathology and Medicine Laboratory**, v. 39, n. 2, p. 179-184, June 2003.

SAEGUSA, M.; HASHIMURA, M.; YASHIDA, T.; OKAYASU, I. Beta- catenin mutation and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, v.84, n. 2, p. 209-217, January 2001.

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. 28, n. 12, p.2459-2466, December 2007.

SEIFERT G, BROCHERIOU C, CARDESA A, EVESON JW. WHO International Histological Classification of Tumours. Tentative Histological Classification of Salivary Gland Tumours. **Pathology, Research and Practice**, v. 186, n. 5, p. 555-581, October 1990.

SEIFERT, G.; BATSAKIS, J.G.; BROCHERIOU, C.; CARDESA, A.; DARDICK, I.; ELLIS, G.L., et al. Histological Typing of Salivary Gland Tumors. **WHO International Histological Classification of Tumours**. Berlin, 2nd edition. Springer Verlag, 1991, p. 24-26.

SERVATO, J. P. S. **Imunolocalização de Wnt-1, β-Catenina e c-Myc em adenomas de células basais de glândula salivar**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Uberlândia. 2011, 59f.

SHAKOORI A.; OUGOLKOV A.; YU ZW.; ZHANG B.; MODARRESSI MH.; BILLADEAU DD.; MAI M.; TAKAHASHI Y.; MINAMOTO T. Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 334, n. 4, p. 1365-1373, September 2005.

SHIEH, Y.S.; CHANG, L.C.; CHIU, K.C.; WU, C.W.; LEE, H.S. Cadherin and Catenin expression in mucoepidermoid carcinoma: correlation with histopathologic grade, clinical

stage, and patient outcome. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 32, n. 5, p. 297-304, May 2003.

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 & Neck**, v. 29, n. 6, p. 577-584, June 2007.

SURANA, R.; SIKKA, S.; CAI, W.; SHIN, E.M.; WARRIER, S.R. et al. Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1845, n. 1, p. 53-65, January 2014.

TCHACKRAY, A.C.; SOBIN, L.H. **World Health Organization international histological classification of tumours: histopathological typing of salivary gland tumours**, 2nd. Berlin: Springer-Verlag, 1972.

TIAN, Z.; LI, L.; WANG, L.; HU, Y.; LI, J. Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 39, n. 3, p. 235-242, March 2010.

TRINK, B.; OKAMI, K.; WU, I.; SRIURANPONG, V.; JEN, J.; SIDRANSKY, D. A new human p53 homologue. **Nature Medicine**, v. 4, n. 7, p. 747-748, July 1998.

WARNER, S.M.; HACKETT, T.L.; SHAHEEN, F.; HALLSTRAND, T.S.; KICIC, A.; STICK, S.M.; KNIGHT, D.A. Transcription factor p63 regulates key genes and wound repair in human airway epithelial basal cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 49, n. 6, p. 978-988, December 2013.

WU N, ROLLIN J, MASSE I, LAMARTINE J, GIDROL X. p63 regulates human keratinocyte proliferation via MYC-regulated gene network and differentiation commitment through cell adhesion-related gene network. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 8, p. 5627-5638, February 2012.

ZARBO RJ. Salivary gland neoplasia: a review for the practicing pathologist. **Modern Pathology**, v. 15, n. 3, p. 298-323, March 2002.

ZHANG Y.; CALL MK.; YEH LK.; LIU H.; KOCHEL T.; WANG IJ.; CHU PH.; TAKETO MM.; JESTER JV.; KAO WW.; LIU CY. Aberrant expression of a beta-catenin gain-of-function mutant induces hyperplastic transformation in the mouse cornea. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 1285-1294, April 2010.

ZHOU, C.X.; GAO, Y. Aberrant expression of beta-catenin, Pin1 and cyclin D1 in salivary adenoid cystic carcinoma: relation to tumor proliferation and metastasis. **Oncology Reports**, v. 16, n. 3, September 2006.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT E SHH E A PECULIAR EXPRESSÃO NUCLEAR DE BETA-CATENINA EM ADENOMA DE CÉLULAS BASAIS

Pesquisador: SÉRGIO VITORINO CARDOSO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09890512.3.0000.5152

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA (UFU)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 180.356

Data da Relatoria: 30/11/2012

Apresentação do Projeto:

Considerando a oportunidade de aprimoramento de critérios de diagnóstico, e ainda a ausência de conhecimento científico abrangente sobre a influência das vias WNT e SHH no adenoma de células basais (ACB) em particular, mas também em outros tumores de glândula salivar, o estudo irá testar a hipótese de que a expressão nuclear forte e frequente de beta-catenina em ACB é um diferencial claro para outros tumores com citodiferenciação basalóide (adenocarcinoma de células basais, carcinoma adenóide cístico), mioepitelial (adenoma pleomórfico) e tubular (adenoma canalicular), e pode ser útil no diagnóstico diferencial dessas lesões. Além disso, alterações na sinalização da via WNT e, ou, SHH podem ser responsáveis pelo achado típico de marcação nuclear forte e intensa de beta-catenina em ACB, em comparação com o padrão de expressão dessas moléculas em glândula salivar normal e em outros tumores de glândula salivar.

Objetivo da Pesquisa:

É objetivo geral do estudo obter informações abrangentes a respeito da participação das vias de sinalização WNT e SHH no desenvolvimento de tumores de glândula salivar com citodiferenciação basalóide, mioepitelial e tubular, com particular ênfase no adenoma de células basais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo não oferece nenhum risco direto à saúde dos sujeitos, visto tratar-se de estudo retrospectivo. No entanto, foi previsto que o consumo de parte do "bloco de biópsia" pode conferir risco no sentido de utilizar material que poderá ser necessário para alguma avaliação do serviço.

Também consideraram o risco de divulgação de informações pessoais, sendo que para ambas as situações, foram apresentadas estratégias para prevenção das situações.

Como benefícios, diferentes questões foram citadas, tais como avanço tecnológico aplicado ao diagnóstico do ACB; conhecimento científico quanto ao tema em estudo e formação de pessoal no desenvolvimento de pesquisas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo retrospectivo, descritivo, tipo série de 56 casos diagnosticados como adenoma de células basais, adenoma pleomórfico, adenoma canalicular, adenocarcinoma de células basais e carcinoma adenóide cístico. As fontes de material e informações necessárias ao estudo serão provenientes de arquivo do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Para caracterização da amostra, de cada caso serão recuperadas informações demográficas dos pacientes (sexo e idade), bem como a localização anatômica da lesão. As análises imunohistoquímicas das proteínas betacatenina, E-caderina, Wnt1a, Wnt2, Wnt3a, Wnt4, Wnt5, Frizzled-7, Wif1, SFRP-1, SFRP-2, CK1 epsilon, GSK3beta, APC, c-myc, ciclina D1, SHH, PTCH, SMO, Gli1, Gli3 e galectina-3 serão feitas em cortes histológicos obtidos de material arquivado, incluído em parafina. Seguir-se-á o protocolo estabelecido no Laboratório sede. Para análise da reatividade imunoistoquímica, será utilizado sistema de fotomicrografia composto por microscópio acoplado a câmera fotográfica. Para cada caso, serão inicialmente definidas as áreas de hot spot da marcação e, dentre elas, serão obtidas imagens digitais daquelas que apresentem morfologia histopatológica mais característica de cada lesão. Inicialmente, o padrão de marcação de cada antígeno será descrito conforme os diferentes padrões de citodiferenciação em cada tumor, com ênfase na diferenciação basalóide, mioepitelial e tubular, conforme presentes. Em seguida, todas as células tumorais das áreas de hot spot, até o máximo de 800, serão avaliadas para se determinar a proporção de células positivas, denominada $\%$ índice de marcação. Ao final, para definição de categorias de marcação, cada amostra será classificada em uma de três classes: 0 - ausência de reatividade, 1 - reatividade observada em até 30% das células, e 2 - reatividade em mais de 30% das células. O cronograma do estudo indica que o rastreamento e seleção de casos terá início em fevereiro de 2013 e o término, o qual culmina com o relatório da pesquisa, em dezembro de 2014. O custo total será na ordem de R\$ 135.315,84 financiados parcialmente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Valor Global: R\$ 49.915,84).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram adequadamente preenchidos, apresentados e assinados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial: dezembro de 2013.

Data para entrega de Relatório Final: dezembro de 2014.

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

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

¿ O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

¿ O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

↳ O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e ANVISA junto com seu posicionamento.

↳ Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

UBERLANDIA, 21 de Dezembro de 2012

Assinador por:

Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)