

João Paulo Silva Servato

**Imunolocalização de Wnt-1,  $\beta$ -Catenina e c-Myc  
em adenomas e adenocarcinomas de células  
basais de glândula salivar**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Odontologia da Universidade de Uberlândia, para  
obtenção do Título de Mestre em Odontologia na  
Área de Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2011

João Paulo Silva Servato

**Imunolocalização de Wnt-1,  $\beta$ -Catenina e c-Myc  
em adenomas e adenocarcinomas de células  
basais de glândula salivar**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do Título de Mestre em Odontologia. Área de Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

Banca Examinadora:

Professor Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

Professor Dr. Adriano Mota Loyola

Professor Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Uberlândia, 2011



**ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA 213<sup>a</sup> DEFESA DE MESTRADO  
DO CD JOÃO PAULO SILVA SERVATO DO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DESTA UNIVERSIDADE.**

Às nove horas do dia vinte de dezembro do ano de dois mil e onze, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno JOÃO PAULO SILVA SERVATO com o título: "Imunolocalização de Wnt-1, B-catenina e c-Myc em adenomas e adenocarcinomas de células basais de glândula salivar." O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Dissertações e Teses da Biblioteca desta Universidade. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora.

Uberlândia, 21 de dezembro 2011.

Sérgio Vitorino Cardoso  
Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso  
Titulação: Doutor  
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

APROVADO  
Aprovado/Reprovado

Adriano Mota Loyola  
Prof. Dr. Adriano Mota Loyola  
Titulação: Doutor  
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

APROVADO  
Aprovado/Reprovado

Bonan  
Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan  
Titulação: Doutor  
Universidade Federal da Paraíba

APROVADO  
Aprovado/Reprovado

## Dedicatória

*“Dedico esse trabalho aos meus Pais pelo incentivo e apoio, sem os quais essa Jornada tornar-se-ia impossível.”*

## **Agradecimentos**

Ao “Arquiteto deste Universo” por ter me agraciado com incontáveis “Longos dias e Belas noites”.

Ao Professor Sérgio Vitorino Cardoso, por ter provido a oportunidade da realização deste Mestrado, e por todos os ensinamentos que vão muito além dos acadêmicos. Pelo exemplo de paciência, docência, ética, respeito, dedicação e sinceridade. Serei eternamente grato por tudo!

Ao Professor Adriano Mota Loyola, por todos os ensinamentos e oportunidades prontamente oferecidas, pelo exemplo de homem honesto, digno, dedicado, trabalhador e por toda amizade que cultivamos.

Ao Professor Paulo Rogério de Faria, por toda a ajuda oferecida, sem a qual este trabalho nunca seria concretizado.

Aos médicos do Instituto Nacional do Câncer, em especial a Dr. Ana Lúcia Amaral Einserberg, Fernando Luiz Dias e a própria Instituição pela disponibilização das amostras.

À Professora Karen Renata Nakamura Hiraki, por todos os ensinamentos nessa Jornada.

A todos os Professores e Coordenadores deste Programa de Pós-graduação, por terem me ensinado pacientemente a “arte” da Docência.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Bucal: Adalci dos Anjos Ferreira, Ângela Maria Pereira, Carla Reis Machado Gomes, Laís Borges Muniz, e Talita Franco sem vocês essa etapa seria extremamente mais difícil.

Meu muito obrigado pela amizade, paciência e por todos os momentos compartilhados. Jamais me esquecerei de vocês.

Aos grandes amigos do curso de Mestrado: Rodrigo Dantas (Jaíba do Nordeste), Crisnicaw Verissimo, Josemar Martins, Talita Dantas, Éverton Lelis, Roberta Rosa, Aline Bicalho e Maiolino Thomaz, por todos os momentos inesquecíveis, e pelo exemplo de profissionais éticos e qualificados que se tornaram.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo nesse momento da minha vida.

Aos eternos irmãos: Frederico Figueiredo Barcelos, Ítalo Meneghini, Lucas Silva de Faria, Luiz Henrique Santos Silva, Pedro Henrique Rezende Spini, Rodrigo Rodrigues da Luz e Vinícius Silva Alves pela amizade e apoio incondicional ao longo todas essas décadas, sem vocês eu nada seria.

A meu grande amigo Luiz Fernando Barbosa de Paulo por toda a ajuda, amizade e companheirismo. Amizade que foi uma das maiores conquistas deste Mestrado.

Aos amigos da República Lambasnelas, em especial ao velho amigo Lucas Silva de Faria (The Power), por todos os apelidos (Neandertal, Grizzly bear, Boca de sacola, etc.) e por todos os momentos iluminados que passamos juntos.

Aos eternos amigos da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP (Caril Amaral, Igor Mariotto Beneti, Lígia Peixoto, Lígia Prandi, Renato Colenci e Tiago Leandro Marciano) por tudo que vivemos e ainda viveremos juntos.

*“Stay strong  
Stay true  
Be brave  
It all comes down to you”*

**-Ozzy Osbourne e Kevin Churko-**

*“Porque foi tão fácil conseguir  
E agora eu me pergunto "e daí?"  
Eu tenho uma porção  
De coisas grandes prá conquistar  
E eu não posso ficar aí parado...”*

**-Raul Seixas-**

# **Sumário**

Resumo -----	6
Abstract -----	7
1- Introdução: -----	8
2- Revisão de Literatura -----	10
3- Proposição -----	33
4- Material e Método -----	34
5- Resultados -----	39
6- Discussão -----	44
7- Conclusão -----	47
Referências -----	48

## Resumo

**Introdução:** A detecção imunoistoquímica de  $\beta$ -Catenina nuclear tem sido amplamente empregada para demonstrar ativação da via canônica Wnt/ $\beta$ -Catenina em uma grande variedade de neoplasias humanas, incluindo adenoma de células basais e adenocarcinoma de células basais de glândula salivares. Todavia, a imunolocalização de outras proteínas dessa via ainda seja desconhecida, e por isso foi proposto o presente trabalho, que avaliou comparativamente a imunolocalização de Wnt1,  $\beta$ -Catenina e c-Myc no adenoma de células basais e adenocarcinoma de células basais.

**Materiais e Métodos:** Técnica imunoistoquímica por estreptavidina-biotina-peroxidase foi empregada para investigar a expressão das moléculas de interesse em 28 casos de adenoma de células basais e quatro de adenocarcinoma de células basais. Cada reação foi avaliada por critérios subjetivos e semiquantitativos, e comparados estatisticamente.

**Resultados:** Wnt1 foi positiva em 14 casos (50.0%) quase sempre em pequena proporção de células, de baixa intensidade e restrita ao citoplasma.  $\beta$ -Catenina foi detectada no núcleo das células tumorais em todos os tumores, sendo o padrão prevalente em 67.9% deles. Nos tumores com diferenciação tubular, esse achado foi geralmente restrito às células abluminais. C-myc foi detectado em 20 casos (71.4%) em proporção e intensidade variada das células tumorais, sempre em padrão citoplasmático. Não foi identificada nenhuma associação entre a expressão dessas moléculas nos adenomas de células basais. Dois casos recorrentes mostraram elevados índices de Quickscore. Para os adenocarcinomas de células basais, os achados foram semelhantes, exceto por não ter sido comum marcação nuclear de  $\beta$ -Catenina.

**Conclusões:** Os resultados observados confirmam que a compartmentalização nuclear de  $\beta$ -Catenina é uma característica dos adenomas de células basais, a qual pode ser útil na sua distinção para com o adenocarcinoma de células basais. Por outro lado, tal característica não pode ser decorrente da ativação da Via canônica Wnt/  $\beta$ -Catenina, ou ao menos da expressão de seu principal agonista (Wnt1). Outros agonistas desta via devem ainda ser estudados, como Wnt3 e Wnt8. Da mesma forma, possíveis efeitos relevantes da localização nuclear de  $\beta$ -Catenina não parecem ser mediados pela expressão de c-Myc.

## Abstract

Introduction: The immunohistochemical detection of nuclear  $\beta$  Catenin has been widely used to demonstrate activation of the canonical Wnt/ $\beta$ - Catenin pathway in a wide variety of human cancers, including basal cell adenoma and basal cell adenocarcinoma salivary gland, although the immunolocalization of other proteins of this pathway is still unknown. The objective of this study was to access the immunolocalization of Wnt1,  $\beta$ -catenin and c-Myc in the basal cell adenoma and basal cell adenocarcinoma.

Materials and Methods: We studied the immunolocalization of Wnt1,  $\beta$ -catenin and c-Myc in a series of four 28 basal cell adenoma and four basal cell adenocarcinoma, by immunohistochemistry using the streptavidin-biotin peroxidase method.

Results: Wnt1 was positive in 14 cases (50.0%) always in a small proportion of cells, low intensity and restricted to the cytoplasm.  $\beta$ -Catenin was detected in the nucleus of tumor cells in all cases, being the prevalent pattern in 67.9% of them. In tumors with tubular differentiation, this finding was generally restricted to abluminal cells. C-myc was detected in 20 cases (71.4%) and it varied in proportion and intensity of tumor cells, always in cytoplasmic pattern. We could not identify any association between the expressions of these molecules in basal cell adenomas. Two recurrent cases showed high levels of Quickscore. For basal cell adenocarcinomas, the findings were similar, except that it was not common nuclear staining of  $\beta$ -Catenin.

Conclusions: Our results confirm that the nuclear compartmentalization of  $\beta$ -Catenin is a feature of basal cell adenomas, which may be useful in their distinction to the basal cell adenocarcinoma. On the other hand, this feature cannot be due to activation of the canonical Wnt /  $\beta$ -Catenin, or at least the expression of its main agonist (Wnt1). Other agonists of this pathway remain to be investigated, such as Wnt3 and Wnt8. Similarly, the possible effect of the nuclear localization of  $\beta$ -catenin does not appear to be mediated by the expression of c-Myc.

## 1- Introdução

---

O adenoma de células basais é um tumor benigno das glândulas salivares caracterizado pela aparência basalóide das células neoplásicas e pela ausência do componente estromal mixocondróide que é típico do adenoma pleomórfico. Representa até 3% de todos os tumores das glândulas salivares, e geralmente são diagnosticados em mulheres, principalmente na sétima e oitava década de vida, com até 75% dos casos acometendo a glândula parótida. Pouco se conhece a respeito da causa e dos mecanismos envolvidos no surgimento desse tumor. O adenocarcinoma de células basais se difere do adenoma de células basais por apresentar crescimento infiltrativo, atipia celular, mitose freqüentes e potencial de metástase. A maioria dos adenocarcinomas de células basais se desenvolve “*de novo*”, mas a sua evolução a partir de adenoma de células basais já foi relatada (de Araujo, 2005; Ellis e Auclair, 2008).

A família de proteínas de sinalização Wnt participa em vários eventos do desenvolvimento embrionário e também tem sido implicada na homeostase de tecidos adultos. Os sinais dessa via são pleiotrópicos, com efeitos que incluem estímulos mitogênicos, de sobrevivência e de diferenciação celulares (Yost et al., 1996; 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). Os efeitos proto-oncogênicos da proteína Wnt1 foram descobertos há mais de 18 anos atrás, incitando intensa investigação sobre o papel dos genes *WNT* na etiogênese das neoplasias (Nusse e Varmus, 1982). Grande parte dos efeitos decorrentes dessa via de sinalização depende da proteína  $\beta$ -Catenina.

Essa molécula é um dos componentes das junções aderentes, bem como um coativador de transcrição implicado, por exemplo, na transdução de estímulos mecânicos e bioquímicos recebidos pela membrana celular até o núcleo. Dessa forma, em células epiteliais quiescentes  $\beta$ -Catenina é observada junto à membrana plasmática. Na presença de sinalização por Wnt1, a  $\beta$ -Catenina é estabilizada e posteriormente transportada para o núcleo, onde forma um complexo com os fatores de transcrição TCF/TLF e então ativa a transcrição de

diversos genes envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celulares, tais como *MYC* (Hai et al., 2010; Rao e Kühl, 2010; Lucero et al., 2010).

Em algumas neoplasias, observa-se translocação de  $\beta$ -Catenina para o núcleo, fato que contribui para aumento da população celular. Por exemplo, a literatura informa que o acúmulo nuclear de  $\beta$ -Catenina parece ser uma característica distintiva do adenoma de células basais quando comparados com outros tumores das glândulas salivares. Essa característica foi relatada por Prado et al. (2007) e recentemente corroborada por Kawahara et al. (2011), que também sugeriram que o acúmulo nuclear de  $\beta$ -Catenina em adenoma de células basais estaria relacionado à diferenciação mioepitelial e que seria coincidente com mutações ativadoras no gene que codifica a  $\beta$ -Catenina (*CTNNB1*). Entretanto, essa última alteração foi observada em apenas metade dos casos, de forma que outros fatores devem estar envolvidos na determinação da expressão alterada de  $\beta$ -Catenina neste tumor.

Os efeitos oncogênicos da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -Catenina foram investigados em vários tipos de neoplasias (Nusse e Varmus, 1982; Yost et al., 1996; Furuse et al., 2006; Polakis, 2007; Queimado et al., 2008; Hai et al., 2010; Espada et al., 2009; Lucero et al., 2010; Chandrashekhar et al., 2011), incluindo carcinoma adenóide cístico (Daa et al., 2005; Zhou e Gao, 2006), adenomas pleomórficos (Genelhu et al., 2007; Fonseca et al., 2008) e carcinomas mucoepidermóides (Shieh et al., 2003; Shiratsuchi et al., 2007) de glândulas salivares, mas as informações disponíveis sobre adenoma de células basais ainda são restritas a  $\beta$ -Catenina.

O objetivo deste estudo foi investigar se o acúmulo de  $\beta$ -Catenina nuclear no adenoma de células basais está relacionado à expressão de Wnt1 e c-Myc, na tentativa de melhor compreender a patogênese desta lesão. Além disso, foram investigadas possíveis diferenças na expressão dessas moléculas entre o adenoma de células basais e adenocarcinoma de células basais de glândulas salivares.

## 2 - Revisão da Literatura

---

### 2.1 - Tumores de glândula salivar

As glândulas salivares são órgãos exócrinos responsáveis pela produção e secreção de saliva. São constituídas pelas glândulas parótida, submandibular, sublingual, e por glândulas menores. Estas últimas são numerosas e estão amplamente distribuídas por toda a boca e orofaringe. Glândulas similares estão presentes nas vias respiratórias superiores, trato nasossinusal e seios paranasais (Eveson et al., 2005).

Neoplasias das glândulas salivares podem mostrar uma gama impressionante de padrões morfológicos entre diferentes tipos tumorais e por vezes dentro de uma mesma massa tumoral. Além disso, a ocorrência de tumores híbridos, a possibilidade de desdiferenciação e a propensão de tumores benignos em malignizar-se podem confundir a interpretação histopatológica. A nova classificação nosológica dos tumores de glândula salivar proposta pela Organização Mundial da Saúde em 2005 (Barnes et al., 2005) dividiu todos estes tumores em 34 entidades, sendo 24 dessas lesões malignas e 10 benignas. Além disso, diversas outras lesões podem acometer primariamente esses órgãos (Eveson et al., 2005; Elis e Auclair, 2008).

A epidemiologia dos tumores glândula salivar ainda não é bem documentada pela literatura internacional (Pinkston e Cole, 1999). Em muitos estudos os dados estão restritos quanto à localização, focando-se apenas em neoplasias da glândula parótida ou em tumores das glândulas salivares maiores e/ou menores. Por sua vez outros artigos têm apenas incluídos os tumores malignos, os quais representam uma porção pequena do total destas lesões, enquanto outros se limitam a documentar a freqüência dessas doenças em crianças e adolescentes. (Owens e Calcaterra, 1982; Takahama Junior et al., 2009; Thariat et al., 2011). Além disso, muitos trabalhos utilizam classificações nosológicas distintas, sendo estas classificações muitas vezes ultrapassadas, dificultando a comparação entre eles.

A incidência global anual estimada para todo o grupo de tumores de glândula salivares varia de 0,4 a 13,5 casos por 100.000 habitantes (Eveson et., al 2005, Elis e Auclair, 2008), enquanto a frequência de lesões malignas varia de 0,4 a 2,6 casos por 100.000 habitantes (Eveson, et. al 2005, Elis e Auclair, 2008). Nos Estados Unidos, neoplasias malignas das glândulas salivares são responsáveis por 6% dos cânceres de cabeça e pescoço, e 0,3% de todas as malignidades (Ries et al., 1991). No Brasil vários estudos já foram realizados sobre a frequência dessas lesões, em diversos centros de diagnóstico, mas a real incidência dessas lesões na população geral é até hoje desconhecida.

O tipo tumoral mais comum é o adenoma pleomórfico, que responde por cerca de 50% de todos os tumores. O tumor de Warthin é o segundo de maior frequência entre tumores benignos, seguido pelo adenoma de células basais. Na maioria dos estudos, o carcinoma mucoepidermóide é o tumor maligno mais comum (Eveson et al., 2005, Elis e Auclair, 2008).

## **2.2 - Adenoma de células basais**

O adenoma de células basais é uma neoplasia epitelial benigna de glândulas salivares, caracterizada por células tumorais com aspecto basalóide relativamente uniforme, monomórficas, bem como pela ausência de componente estromal mixocondróide (Araújo, 2005; Ellis e Auclair, 2008). Outros termos já foram eventualmente utilizados para se referir a essa lesão, tais como adenoma tubular, adenoma trabecular, tumor análogo dermal e adenoma basalóide (Nagao et al., 1982).

A nomenclatura adenoma de células basais foi empregada pela primeira vez por Kleinsasser e Klein, em 1967, ao descreveram nove tumores com características histomorfológicas semelhantes e que deveriam ser considerados como uma nova entidade. Entretanto, a primeira classificação proposta pela OMS para as neoplasias de glândulas salivares, em 1972, não aderiu a tal sugestão, agrupando todos os tumores benignos em adenomas pleomórficos ou monomórficos, tendo sido os adenoma de células basais incluídos nesse último grupo (Thackray e Sabin, 1972).

Posteriormente, na segunda edição da OMS sobre a nosologia dos tumores de glândula salivar foi reconhecido que algumas das lesões que antes eram aglomeradas dentro do grupo de “adenomas monomórficos” não eram absolutamente monomórficas, e que já existiam dados suficientes para estabelecer critérios claros para classificar separadamente várias entidades específicas (Seifert et al., 1991). Assim, foi reconhecido que tumores de células basais apresentam aspecto histológico e prognóstico diversos, distinguindo o adenoma de células basais de outros tipos histológicos tais como o adenocarcinoma de células basais e o carcinoma adenóide cístico (Seifert, 1991).

Na terceira versão, de 2005, a distinção foi mantida, tendo sido incluídos dados epidemiológicos, clínicos, patológicos, genéticos e imunoistoquímicos para se caracterizar melhor o adenoma de células basais (de Araújo, 2005).

Adenomas de células basais são tumores incomuns, constituindo entre 0,5% e 5,5% de todos os tumores de glândulas salivares e aproximadamente 6% dos tumores epiteliais benignos (Eveson et al., 2005; Ellis e Auclair, 2008; Tian et al., 2009; Cordeiro, 2010). Há uma discreta variação na frequência do adenoma de células basais entre países (Ellis e Auclair, 2008). Um exemplo dessa variação é facilmente visualizado quando comparamos alguns estudos: no Brasil (Kalluf, 2006) o adenoma de células basais representa aproximadamente 7,4% de todos os tumores benignos, já para Ito et al., (2005) a frequência de adenoma de células basais era de 0.6% da amostra. Na China, Tian et al. (2009) esta neoplasia representa pouco mais de 5.0% da amostra. Em outros trabalhos essa mesma frequência é pouco superior à 2% da amostra (Long-Jiang et al., 2008; Ochicha et al., 2009; Dhanithai et al., 2009)

Seu diagnóstico é geralmente estabelecido em adultos e idosos do sexo feminino, com pico de frequência na sétima década de vida (Ellis e Auclair, 2008; Jones et al., 2008; Tian et al., 2009). Tumores com características histológicas de adenomas de células basais que sejam congênitos ou detectados na primeira infância são mais bem classificados na atualidade como sialoblastomas (Eveson et al., 2005, Ellis e Auclair, 2008).

O adenoma de células basais é discretamente mais frequente em mulheres do que em homens (Jones et al., 2008; Tian et al., 2009). Todavia, o subtipo membranoso é mais encontrado em pacientes do sexo masculino (Eveson et al., 2005; Elis e Auclair, 2008).

Adenomas de células basais são amplamente mais comuns em glândulas salivares maiores, em particular na parótida (75% dos casos, sendo o lobo superficial o mais afetado), com raros casos surgindo na glândula submandibular (Eveson et al., 2005; Elis e Auclair, 2008; Tian et al., 2009; Cordeiro, 2010).

Apenas 3% dos adenomas de células basais são diagnosticados em sítios intraorais associados a glândulas salivares menores (Ellis e Auclair, 1991; Tian et al., 2009). É importante mencionar, entretanto, que um estudo descreveu prevalência notável de adenoma de células basais em glândulas menores (Jones et al., 2008). O lábio superior é o local mais comum para esses casos, seguido da mucosa bucal (Eveson et al., 2005, Elis e Auclair, 2008; Tian et al., 2009; Cordeiro, 2010)

Histologicamente, os adenomas de células basais mostram predominância de células uniformemente basaloides, ou seja, pequenas, com citoplasma escasso e núcleos hiperchromáticos, arredondados a ovóides, que estão frequentemente agregados perto da interface com o estroma, na periferia dos ninhos epiteliais, podendo aparecer em paliçada. Podem também existir células maiores com citoplasma mais abundante, núcleo pálido, basofílico e alguns contendo um ou mais nucléolos pequenos. Na maioria dos adenomas de células basais, há também células cuboidais que circundam pequenos lumens, sendo denominadas células luminais (Araújo, 2005; Ellis e Auclair, 2008). Eventualmente, as células maiores (não luminais) mostram fenótipo morfológico, imunoistoquímico e ultraestrutural que sugere tratar-se de células mioepiteliais (Eveson et al., 2005; Elis e Auclair, 2008).

Os agregados de células tumorais se mostram claramente delimitados do estroma. Esse geralmente não é abundante e freqüentemente é pouco vascularizado e moderadamente celularizado, com aspecto muitas vezes mixóide, mas nunca mixocondróide como aquele visto no adenoma pleomórfico,

havendo ainda lâmina basal discreta. Raramente pode ser observado um infiltrado composto por linfócitos e adipócitos maduros (Eveson et al., 2005, Elis e Auclair, 2008; Cordeiro, 2010).

Quanto à arquitetura tecidual, o adenoma de células basais pode se apresentar sólido, trabecular, tubular ou membranáceo. Cada tumor pode mostrar mais de uma dessas características, havendo usualmente predomínio de uma delas, a qual deve ser considerada para fins de classificação histopatológica (Araújo, 2005). Essa classificação, no entanto, não implica em comportamento biológico diferenciado (Eveson et al., 2005; Elis e Auclair, 2008), exceto pela rara variante membranosa, que mostra maior propensão a crescimento multifocal, recidivas e transformação maligna (Eveson et al., 2005, Elis e Auclair, 2008). Nesse sentido, o subtipo sólido tem sido relatado como o mais freqüente (Zarbo 2002; Araújo 2005; Ellis e Auclair, 2008). Em todos os subtipos, achados eventuais podem ser observadas, tais como degeneração cística, formações cribriformes, ou ainda agregados circulares de células neoplásicas com diferenciação escamosa, inclusive queratinizadas (Araújo, 2005).

Na variante sólida, as células epiteliais neoplásicas agregam-se caracteristicamente em amplos lençóis, ilhotas menores ou faixas largas e por vezes anastomosadas, sendo comum haver predomínio de um desses padrões em cada tumor. Células menores são mais numerosas, eventualmente ocasionando aspecto basofílico aos agregados tumorais que, além disso, apresentam células periféricas (na interface com o estroma) arranjadas em paliçada. Finalmente, o estroma tende a ser composto por tecido conjuntivo denso, desorganizado (Ellis e Auclair, 2008). Estruturas ductiformes não são proeminentes nesse padrão, e os ninhos tumorais não possuem uma membrana basal eosinofílica tão espessa como aquela vista no adenoma de células basais membranoso (Ellis e Auclair, 2008).

O subtipo trabecular caracteriza-se por estreitos cordões de células neoplásicas, intensamente entrelaçadas. Células maiores são mais comuns, enquanto o empalhamento periférico é menos proeminente que na variante sólida. Ainda, o estroma é também menos denso, podendo apresentar-se frouxo e bastante similar àquele característico do adenoma canalicular.

Finalmente, em alguns tumores os cordões neoplásicos podem se mostrar separadas por quantidade muito pequena de estroma, inclusive mimetizando o padrão sólido (Ellis e Auclair, 2008).

O padrão tubular se assemelha ao trabecular pelo fato de que as células neoplásicas também se organizam em cordões anastomosados, mas exibe characteristicamente células com diferenciação ductal, havendo ainda formações luminais proeminentes, numerosas e de diâmetro variado. Uma ou várias camadas de células basalóides não luminais, periféricas, devem estar presentes, fato importante para diferenciá-lo do adenoma canalicular (Ellis e Auclair, 2008).

Em muitos tumores é praticamente impossível determinar se há predominância de formações tubulares ou trabeculares, de forma que se justifica o uso do termo “tubulotrabecular” (Araújo, 2005).

O adenoma de células basais membranoso tem uma interessante e distinta figura microscópica. Essa variante apresenta arranjo das células epiteliais semelhante ao subtipo sólido (Ellis e Auclair, 2008). As ilhotas epiteliais são arranjadas em lóbulos, densamente entrepostos, assemelhando-se a peças de um quebra-cabeça. A característica que distingue esse padrão é a presença de espessa camada hialina, eosinofílica, ao redor dos ninhos epiteliais, a qual corresponde à membrana basal e por vezes toma praticamente todo o estroma tumoral. O simples espessamento de material hialino ao redor dos agregados epiteliais, todavia, não é patognomônico do subtipo membranoso, podendo ser encontrado em outras variantes, em especial na sólida (Ellis e Auclair, 2008). Além de características histológicas peculiares, a alta incidência de recorrências e a maior possibilidade de transformação maligna são fatores que justificam a separação do adenoma de células basais membranoso das outras variantes (Nagao et al., 1982).

Imunopositividade para queratina, marcadores miogênicos, vimentina e p63 indicam diferenciação mioepitelial e ductal no adenoma de células basais, especialmente nas células abluminais do subtipo tubular. Também as células periféricas empaliçadas do tipo sólido podem corar para vimentina e marcadores miogênicos. O padrão de expressão reflete os diferentes estágios

de diferenciação do tumor, variando do tipo sólido, menos diferenciado ao tipo tubular, o mais diferenciado (de Araújo 2005; Ellis e Auclair, 2008).

Como para a maioria dos tumores benignos de glândulas salivares, o prognóstico para pacientes portadores de adenomas de células basais é bom. Apenas tumores localizados no lobo profundo da parótida apresentam maiores chances de recorrência quando comparado a outras localizações (Bova, Saylor e Coman, 2003). Conforme mencionado anteriormente, tumores com padrão membranoso apresentam recorrências mais frequentes (aproximadamente 25% dos casos) em relação aos outros subtipos histopatológicos (Araújo 2005; Ellis e Auclair, 2008). Esse fato pode ser justificado por esses tumores serem geralmente multifocais. A transformação maligna do adenoma de células basais é raramente descrita, sendo mais freqüente para o subtipo membranoso, embora a documentação desse evento seja controversa (Araújo 2005; Ellis e Auclair, 2008).

### **2.3- Adenocarcinoma de células basais**

O adenocarcinoma de células basais é uma neoplasia epitelial maligna e rara das glândulas salivares, composta por células epiteliais basalóides, sendo em linhas gerais semelhante quanto à diferenciação celular e organização tecidual ao adenoma de células basais, mas que, por apresentar crescimento infiltrativo, potencial para metástase, pleomorfismo celular e mitoses atípicas, tem claramente comportamento mais agressivo, sendo portanto considerado uma neoplasia maligna (Ellis, 2005; Ellis e Auclair, 2008).

Até recentemente, tumores malignos das glândulas salivares que mostrassem diferenciação basalóide eram diagnosticados como carcinoma basalóide, adenoma de células basais híbridos, carcinoma adenóide cístico, adenocarcinoma de células basais, carcinoma de células basais e carcinoma ex-adenoma monomórficos (Ellis, 2005; Ellis e Auclair, 2008). De todos esses nomes, hoje existe um consenso que define o termo adenocarcinoma de células basais como o mais adequado para esse tumor, que por sua vez é ainda classificado como de baixo grau de malignidade e também como a

contraparte maligna dos adenoma de células basais, conforme definido por Ellis e Wiscovitch, 1990.

Poucos casos já foram relatados e estes representam menos de 1% dos tumores malignos de glândula salivar. Acometeram em geral pacientes adultos, com média de idade de 60 anos, sem predileção por sexo. Mais de 90% destes tumores ocorrem na glândula parótida, havendo raras descrições em glândulas salivares menores da cavidade oral (Ellis, 2005; Ellis e Auclair, 2008; Tian et al., 2009).

A maioria dos tumores se apresenta clinicamente como aumentos volumétricos indolores, com raros relatos de dor ou sensibilidade. A duração destes tumores antes da excisão varia de semanas a anos. Semelhante a alguns pacientes com adenomas de células basais, os pacientes com adenocarcinomas de células basais podem ter história pregressa de múltiplos tumores de pele e de adenocarcinomas de células basais (Ellis, 2005; Ellis e Auclair, 2008).

Histologicamente, apresentam-se compostos por células epiteliais basalóides, que variam de células pequenas e escuras a outras maiores e mais pálidas, formando padrões histomorfológicos que também são descritos como sólidos, membranosa, trabecular e tubular (Ellis, 2005; Ellis e Auclair, 2008).

O padrão sólido é tipo histológico mais frequentemente relatado e é caracterizado por ninhos de tamanho e forma variável, que são separados por finos septos de estroma de colágeno. No tipo membranoso, os tumores produzem grande quantidade de material hialinizado e eosinofílico. Bandas interconectantes de células basalóides separadas por estroma de tecido conjuntivo não modelado caracterizam o padrão de crescimento trabecular. No tipo tubular, há formação de espaços luminais entre as células basalóides. Focos de diferenciação escamosa podem ser encontrados em alguns tumores. As células tumorais ao longo da interface com o estroma muitas vezes se dispõem em paliçada. O grau de atipia e o número de figuras de mitose variam de um tumor para outro, mas muitas vezes é mínima (Ellis, 2005; Ellis e Auclair, 2008; Tian et al., 2009).

Pode ocorrer infiltração de células tumorais no parênquima glandular adjacente, derme, músculo esquelético, ou gordura periglandular. Embolização ou invasão de nervo periférico é evidente em cerca de um quarto dos tumores. (Ellis, 2005; Ellis e Auclair, 2008; Tian et al., 2009).

A maioria dos adenocarcinomas de células basais provavelmente se desenvolve *de novo*, mas existem relatos de transformação maligna a partir de adenoma de células basais prévios (Ellis, 2005; Ellis e Auclair, 2008). Pouco é conhecido sobre a etiogênese do adenocarcinoma de células basais, mas já foi relatado o ganho de cromossomos em 9p21.1, 18q21.1-q22.3, e 22q11.23-q13.31 como também perdas em 4q25 e 2q24.2-q27 (Toida, et al 2001; Ellis, 2005; Ellis e Auclair, 2008).

Embora os adenocarcinoma de células basais sejam localmente destrutivos e muitas vezes recidivem (aproximadamente 40% dos casos), apenas ocasionalmente (10%) causam metástase e morte dos pacientes. Remoção cirúrgica completa do tumor é o tratamento recomendado. Esvaziamento cervical não é indicado para pacientes sem massas palpáveis nos linfonodos cervicais (Toida, et al 2001; Ellis, 2005; Ellis e Auclair, 2008).

## 2.4- Via de sinalização Wnt

A família Wnt de proteínas de sinalização participa em vários eventos de desenvolvimento durante a embriogênese e também tem sido implicada na homeostase de tecidos adultos. Sinais da via Wnt/β-Catenina são pleiotrópicos, com efeitos que incluem estímulo mitogênico, especificação de destino celular e diferenciação. Os efeitos proto-oncogênicos de Wnt foram descobertos há mais de 18 anos atrás, gerando intensa investigação sobre o papel dos genes *WNT* em neoplasias humanas (Espada et al., 2009).

A sinalização por Wnt ocorre por duas vias distintas: canônica (“comum”, principal) e não canônica (Baksh e Tuan, 2007).

A via canônica caracteriza-se pela estabilização da molécula β-Catenina no citoplasma, com posterior translocação nuclear da mesma, que então facilita a

ativação de genes-alvo dos fatores de transcrição TCF/LEF. Na ausência de sinalização por Wnt, ocorre ubiquitinação da  $\beta$ -Catenina e sua consequente degradação por proteosomo. O complexo citoplasmático que marca a  $\beta$ -Catenina para degradação é composto por Axina, proteína APC (Adenomatous Polyposis Coli) e GSK-3 (glicogênio sintetase quinase-3 beta), cuja ação ocorre pela fosforilação de  $\beta$ -Catenina. A ativação da via canônica inicia-se com a liberação parácrina de Wnt, que se liga na célula-alvo ao respectivo receptor de membrana plasmática Frizzled e a correceptores LRP5-6 (“LDL receptor related protein”), os quais transmitem o sinal para Dishevelled (Dsh) e Axina no citosol, levando à inibição da fosforilação de  $\beta$ -Catenina e consequente bloqueio de sua degradação. Dessa forma, há elevação dos níveis de  $\beta$ -Catenina citoplasmática, com posterior acúmulo nuclear e então formação de complexo ativador pela sua associação com os fatores de transcrição TCF/LEF, finalizando com indução transcrecional de genes-alvo efetores (Espada et al., 2009; Hai et al., 2010; Sugimura e Li, 2010; Lucero et al., 2010).

Mutações que promovam a ativação constitutiva da via canônica podem levar a uma grande variedade de neoplasias (Doucas et al., 2005; Logan e Nusse, 2004). O melhor exemplo conhecido é a Polipose Familiar Adenomatosa (FAP), uma doença autossômica dominante em que os pacientes apresentam múltiplos pólipos no cólon associados à estabilização exacerbada de  $\beta$ -Catenina (Ponti, Losi et al., 2008). Por outro lado, mutações que levam a perda de função em Axina foram descritas em hepatocarcinomas (Taniguchi et al., 2002).

A via não canônica não envolve  $\beta$ -Catenina, atuando pelos mecanismos de “planar cell polarity”, o qual guia movimentos celulares durante a gastrulação e é mediada por pequenas Gtpases (Rho e Rac), JNK e Cdc42, ou pelo mecanismo Wnt/ $Ca_2^+$ , o qual pode ao mesmo tempo levar à expressão de proteínas reguladoras da diferenciação celular e ainda atuar como antagonista da via canônica. Nesses casos, Wnt se liga aos receptores Frizzled de forma independente de co-receptores, levando a alterações na localização de proteína efetoras da via, como JNK, Dvl e ROCKII, ou alterações em concentrações de cálcio intracelular. Durante a embriogênese, a via não canônica participa da determinação de polaridade dorso-ventral dos membros,

e também provavelmente na migração neuronal. A via de sinalização Wnt/Ca<sup>2+</sup>, por sua vez pode ser dividida em: 1) Wnt-calcineurina, que regula a expressão do fator de transcrição NFAT, o qual transcreve proteínas relacionadas com a diferenciação celular como, por exemplo: Osterix, DSCR1 e DYRK1A; 2) Via de sinalização Cálcio induzível por CaMKII-TAK1-NLK, a qual antagoniza a via Wnt canônica, suprimindo a transcrição dependente de β-Catenina (Sugimura e Li, 2010).

#### 2.4.1 Wnt1

Existem dezenove genes *WNT* no genoma de mamíferos, conforme apresentado no **Quadro 1** (Katoh, 2005). As proteínas Wnt são glicoproteínas modificadas por lipídios de tamanho muito semelhantes, geralmente contendo 350-400 aminoácidos, e que variam em peso molecular de 39kDa (Wnt7a) a 46kDa (Wnt10a). Pouco se sabe sobre a estrutura das proteínas Wnt, mas é bem estabelecido que todas têm 23 ou 24 resíduos de cisteína e vários sítios de glicosilação, sugerindo que seu dobramento pode depender da formação de múltiplas ligações intramoleculares dissulfeto. Sabe-se também que a região carboxi-terminal pode determinar a especificidade de respostas para Wnt diferentes. Como regra geral, as proteínas Wnt são fatores secretados de forma parácrina. Uma vez secretada, podem associar-se a glicosaminoglicanos na matriz extracelular, ligando-se firmemente à superfície da célula. À parte dessas observações, a localização exata das proteínas Wnt nos vertebrados é pouco compreendida (Espada et al., 2009).

**Quadro 1 - Localização cromossomal dos genes *WNT* em humanos**

Gene	Localização	Fenótipo de funções knockout
WNT1	12q13	Migração e diferenciação do tecido cerebral
WNT2	7q31	Defeitos placentários
WNT2b/13	1p13	Defeitos placentários
WNT3	17q21	Defeitos na gastrulação
WNT3a	1q42.13	Defeitos no desenvolvimento cerebrocaudal e no tubo neural
WNT4	1p35	Defeitos na formação sexual feminina e nos rins
WNT5a	3p14-p21	Membros truncados, encurtamento do eixo ântero-posterior
WNT5b	12p13.3	Membros truncados, encurtamento do eixo ântero-posterior
WNT6	2q35	Defeitos na diferenciação óssea
WNT7a	3p25	Defeitos na polaridade dos membros; infertilidade feminina
WNT7b	22q13.3	Defeitos na polaridade dos membros; infertilidade feminina
WNT8a/d	5q31	Defeitos dorso-ventrais
WNT8b	10q24	Defeitos dorso-ventrais
WNT10a	2q35	Inibição da adipogênese
WNT10b/12	12q13.1	Inibição da adipogênese
WNT11	11q13.5	Migração das células da crista neural
WNT14	1q42	Falha no processo de diferenciação neuronal
WNT15	17q21	Defeitos na homeostasia dos rins
WNT16	7q31	Defeitos na diferenciação hematopoietica

As proteínas Wnt têm sido divididas em duas classes funcionais com base em suas atividades biológicas. Wnt1, Wnt3a e Wnt8 participam da via canônica (Katoh, 2005; Shimura et al., 2005). Wnt4, Wnt5a e Wnt11 estão envolvidas na ativação da via não canônica. A princípio, apenas a via canônica teria papel nas primeiras fases da oncogênese, estimulando a produção de proteínas como c-Myc e Ciclina D1, e consequentemente estimulando a proliferação celular. Logo fica claro que a desregulação dessa via tem importante efeito oncogênico, e de fato tem sido implicada na patogênese de diversos tumores (Sugimura e Li, 2010; Lucero et al., 2010; Espada et al., 2009).

Considerando que via de sinalização Wnt não canônica regula células-tronco, pode-se especular que também desempenhe um papel importante no câncer. Especificamente, como essa via mantém quiescência de células-tronco e inibe a via de sinalização Wnt canônica, tem sido considerada principalmente uma

via supressora de tumores (Espada et al., 2009; Hai et al., 2010; Sugimura e Li, 2010; Lucero et al., 2010).

#### 2.4.2 $\beta$ -Catenina

As cateninas são uma família de moléculas representadas pela  $\alpha$  (102kDa),  $\beta$  (88kDa) e  $\gamma$  (82kDa) catenina. O gene codificante da  $\beta$ -Catenina (*CTNNB1*) está localizado no cromossomo 3, locus 3p22, em uma região freqüentemente alterada em uma variedade de tumores. Seu produto é uma proteína multifuncional, que consiste de domínios N-terminal, central C-terminal, com 130, 500 e de 100 aminoácidos, respectivamente (Barth et al., 1997, Nelson & Nusse, 2004). A região N-terminal possui sítios de fosforilação para a GSK-3 $\beta$ , enquanto que a região C-terminal desempenha uma função transativadora de genes que participam da proliferação celular. A região central contém 12 seqüências repetidas de 42 aminoácidos conhecidos como “repetições armadillo”, e é necessária para a interação com várias proteínas, incluindo caderinas, APC e TCF/LEF (Akiyama, 2000).

Atualmente, duas funções biológicas têm sido reconhecidas para a  $\beta$ -Catenina: adesão intercelular mediante ligação a E-caderina na membrana plasmática, e sinalização intracelular para promover a ativação transcricional de um conjunto grande de genes como o *c-MYC*, *c-FUN*, *c-FRAN1*, *CCCND1*, *ZO-1*, *MMP-7* e *WISP-1* (Espada et al., 2009; Hai et al., 2010; Sugimura e Li, 2010; Lucero et al., 2010).

Recentemente, foi descoberto que outras vias de sinalização que não a via canônica Wnt/ $\beta$ -Catenina poderiam modular a estabilização e acúmulo de da  $\beta$ -Catenina no citoplasma e posteriormente no núcleo. Vias como a EGFR-Akt e Sonic hedgehog são bons exemplos (Cohen, 2004; Fang et al., 2007).

Fang e colaboradores, em 2007, relataram que a ativação do receptor do fator de crescimento epitelial induzia fosforilação e transativação de  $\beta$ -Catenina, por meio da ativação da proteína Akt, que inibe GSK-3 $\beta$  e, ou, fosforila diretamente a  $\beta$ -Catenina.

A proteína Sonic Hedgehog (Shh) atua como sinalizadora autócrina ou parácrina para indução de proliferação celular. Atua pelo bloqueio da interação entre o receptor de membrana Patched (Ptch) e a proteína Smoothened (Smo), dessa forma liberando essa última para ativar o fator de transcrição Gli, que será então responsável pela transcrição de genes ligados à proliferação celular como, por exemplo, Wnt1 (Cohen, 2004).

### 2.4.3 Myc

O gene *C-MYC* está localizado no cromossomo 8, locus 8q24, e é membro de uma família de genes que inclui *N-MYC*, *L-MYC*, e *S-MYC*. É composto de um primeiro exon não codificador e por dois outros exons que codificam o fator de transcrição Myc. *C-MYC* é um gene altamente regulado pelo controle de transcrição gênica, pela estabilidade do respectivo mRNA, e ainda pela curta meia-vida da proteína Myc. Após estímulo mitogênico, *c-MYC* é rapidamente transcrito, alcançando níveis máximos de mRNA em duas horas. Esse mRNA exibe meia-vida de aproximadamente 10 minutos. De forma similar, a proteína Myc tem meia-vida de apenas 25 minutos, sendo então marcada para degradação por fosforilação (Slack e Gascoyne, 2011; Myant e Sansom, 2011).

Myc é uma fosfoproteína nuclear que atua como fator de transcrição, ativando ou reprimindo a transcrição de vários genes. É comumente relatada como um dos produtos finais mais importantes da via de sinalização Wnt/β-Catenina. Para tanto, formam dímeros com a proteína Max. O heterodímero Myc-Max se liga com alta afinidade em seqüências específicas de DNA conhecidas como E-boxes (CACGTG), as quais são regiões específicas para ligação a fatores de transcrição, atuando em associação com a proteína TRRAP para ativar a transcrição gênica, ou ainda reprimindo a transcrição por recrutar metiltransferases (DNMT3A e DNMT3B) com posterior metilação do DNA e silenciamento gênico, especialmente do gene *MIZ1* e outros a ele funcionalmente associados (Slack e Gascoyne, 2011; Myant e Sansom, 2011).

Myc tem sido reconhecida como um fator de transcrição global, pois se acredita que regule a expressão de mais de 10% do genoma humano. Dessa forma,

promove crescimento celular, aumenta o metabolismo celular e mitocondrial, a biossíntese de ácidos nucléicos, ribossomos e proteínas. É também um importante mediador do ciclo celular, ativando genes que codificam oncoproteínas, tais como Ciclina D1, além de inibir proteínas supressoras da proliferação, tais como inibidores de ciclina-quinases, influenciando portanto a progressão da fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> para a fase S do ciclo celular. Myc também estimula a apoptose, pois regula a função da proteína proapoptótica e supressora de tumor p53, inibe as proteínas antiapopóticas Bcl-xL e Bcl2, além de induzir a expressão da proteína proapoptótica BIM e estimular a liberação de citocromo c mitocondrial. Dada a ampla gama de atividade biológica de Myc fica claro que sua desregulação tem potencial oncogênico, conforme já se tem demonstrado para linfomas de células B (Adams et al., 1985). Vários mecanismos para desregulação de MYC em cânceres foram identificados, incluindo translocação cromossômica, amplificação gênica e inserções virais mutagênicas (Slack e Gascoyne, 2011; Myant e Sansom, 2011).

## **2.5 – Papéis da via canônica de sinalização Wnt na embriogênese e reparo das glândulas salivares**

A embriogênese das estruturas orais, incluindo dentes, língua e glândulas salivares dependem de interações epitélio-mesenquimais que envolvem a regulação coordenada de transdução de sinal. A compreensão dos mecanismos moleculares determinantes do desenvolvimento orofacial irá proporcionar novos olhares sobre a etiologia de defeitos congênitos e neoplásicos desses tecidos e órgãos (Harris e Beckendorf, 2007; Hai et al., 2010; Patel et al., 2011; Lin et al., 2011).

A migração celular guiada é necessária para o desenvolvimento correto e bom funcionamento de todos os tecidos. Harris e colaboradores, em 2007, demonstraram que as duas distintas vias de sinalização Wnt regulam a migração de células de glândulas salivares em drosófilas. No início da migração, tais células respondem a um sinal WNT4-Frizzled para o posicionamento adequado dentro do embrião. A interrupção desse sinal, decorrente de mutações tanto em Wnt4 quanto em Frizzled, resulta em

crescimento mal orientado das glândulas salivares, que se curvam ventralmente. Ainda, a eliminação de componentes da canônica via Wnt/β-Catenina, como por exemplo, Dishevelled ou Tcf resultam em defeito semelhante. Análise de um segundo sinal Wnt, que atua através do receptor Derailed, indica uma importante função sinalizadora do Wnt5 no final de migração das glândulas salivares. WNT5 é expressa no sistema nervoso central e age como um sinal inibitório, necessário para manter a migração da glândula salivar em curso. O receptor para WNT5, Derailed, é expresso na parte ativa da migração de glândulas salivares. Em embriões mutantes para Derailed ou Wnt5, a migração da glândula salivar é interrompida, assim a extremidade da glândula migra anormalmente em direção ao sistema nervoso central. Estes resultados sugerem que tanto as interações Wnt4-Frizzled quanto Wnt5-Derailed são necessárias para a migração adequada das glândulas salivares (Harris e Beckendorf, 2007; Hai et al., 2010; Patel et al., 2011; Lin et al., 2011). Morfogênese por ramificação é um mecanismo conservado que ocorre no desenvolvimento de diversos órgãos, tais como o pulmão, glândula adrenal, glândulas mamárias e glândulas salivares, para maximizar a área de superfície dentro de um pequeno volume de tecido. A ramificação ocorre mediante repetitivos processos de fissão e alongamento de estruturas epiteliais esféricas, chamadas *endbuds*, que então invadem o mesênquima circundante. Na glândula salivar, a formação de lúmen ocorre concomitantemente à nova ramificação, de forma controlada, de modo que a ramificação ocorre nas extremidades distais dos ramos epiteliais, enquanto a formação de lúmen se inicia nas extremidades proximais espalhando-se distalmente. Em 2011, Patel et al. observaram interação entre a via de sinalização por FGF e as vias canônica e não canônica de Wnt durante a formação dos ductos de glândula salivar (Harris e Beckendorf, 2007; Hai et al., 2010; Patel et al., 2011; Lin et al., 2011).

Por outro lado, a via canônica de Wnt regula a função de muitas populações de células-tronco em tecidos adultos, mas seu papel no desenvolvimento e regeneração das glândulas salivares é relativamente desconhecido. Em 2010, Hai et al. evidenciaram ativação dessa via em algumas células na camada basal dos ductos intercalados de camundongos recém-nascidos, localização essa coincidente com as células-tronco progenitoras das glândulas salivares.

Essa atividade diminui com a idade dos animais (camundongos), mas é marcadamente aumentada em ductos de glândula salivar durante a regeneração das mesmas. Além disso, a ativação forçada da via canônica de Wnt nas células epiteliais induz proliferação de células ductais, a expansão da população de células-tronco, e ativação ectópica da via de sinalização Hedgehog (Harris e Beckendorf, 2007; Hai et al., 2010; Patel et al., 2011; Lin et al., 2011).

## 2.6 - Sinalização canônica por Wnt em neoplasias

Estudos recentes têm mostrado que a sinalização canônica por Wnt está alterada em diversos tumores, refletindo as diferentes funções da  $\beta$ -Catenina, (Daa et al., 2004; Kudo et al., 2004; Espada et al., 2009; Hai B et al., 2010; Sugimura e Li, 2010; Lucero OM et al., 2010). Por exemplo, muitos cânceres de cólon apresentam mutações esporádicas ou herdadas no gene supressor de tumor APC, causando a síntese de proteína APC truncada, incapaz de se ligar à Axina e à  $\beta$ -Catenina, resultando em expressão constante de c-Myc e outros genes-alvo de  $\beta$ -Catenina, resultando em proliferação neoplásica (Daa et al., 2004; Kudo et al., 2004; Espada et al., 2009; Hai et al., 2010; Sugimura e Li, 2010; Lucero et al., 2010).

Vários estudos identificaram mutações no próprio gene da  $\beta$ -Catenina (*CTNNB1*), inclusive contribuindo para a progressão tumoral. O Quadro 2 apresenta diversas mutações descritas em *CTNNB1* em diversos tipos de tumores, sendo que as mesmas ocorrem sempre no exon 3 e afetam principalmente sítios de fosforilação (Daa et al., 2004; Kudo et al., 2004; Espada et al., 2009; Hai et al., 2010; Sugimura e Li, 2010; Lucero et al., 2010).

**Quadro 2 - Mutações descritas para o gene *CTNNB1*\***

Códon	Mutação	Proteínas	Tumor	Referências
17	GAC→CAC	Asp→His	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
20	GCG→GTG	Ala→Val	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
22	GTT→GCT	Val→Ala	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
29	TCT→TTT	Ser→Fen	Câncer gástrico	Park et al., 1999
32	GAC→GGC	Asp→Gli	Câncer gástrico Carcinoma de ovário	Park et al., 1999 Gamallo et al., 1999

			Câncer de pele	Chan et al., 1999
			Hepatoblastoma	Miyoshi et al., 1998
			Carcinoma de ovário	Gamallo et al., 1999
			Carcinoma hepatocelular	Cui et al., 2003
	GAC→TAC	Asp→Tir	Carcinoma endometrial	Mirabelli et al., 1999
			Câncer de próstata	Voeller et al., 1998
			Meduloblastoma	Giangaspero et al., 2006
			Câncer de pele	Chan et al., 1999
			Hepatoblastoma	Miyoshi et al., 1998
	GAC→AAC	Asp→Asn	Câncer gástrico	Park et al., 1999
			Meduloblastoma	Giangaspero et al., 2006
	GAC→TAC	Asp→ Val	Meduloblastoma	Giangaspero et al., 2006
33			Câncer colorretal	Morin et al., 1997
	TCT→TAT	Ser →Tir	Meduloblastoma	Ellison et al., 2005
			Câncer de pele	Chan et al., 1999
			Carcinoma uterino	Fukuchi et al., 1998
			Câncer de pele	Chan et al., 1999
	TCT→TTT	Ser→Fen	Câncer de próstata	Voeller et al., 1998
			Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
			Meduloblastoma	Giangaspero et al., 2006
			Carcinoma de ovário	Wrigth et al., 1999
	TCT→TGT	Ser→Cis	Meduloblastoma	Giangaspero et al., 2006
34	TCT→TGT	Ser→Cis	Carcinoma de ovário	Gamallo et al., 1999
			Hepatoblastoma	Wrigth et al., 1999
	TCT→CCT	Ser→Pro	Carcinoma endometrial	Mirabelli et al., 1999
			Hepatoblastoma	Miyoshi et al., 1998
	GGA→GTA	Gli→Val	Carcinoma endometrial	Mirabelli et al., 1999
35			Carcinoma hepatocelular	Cui et al., 2003
			Carcinoma de ovário	Wrigth et al., 1999
			Câncer de colorretal	Samowitz et al., 1999
	GGA→GAA	Gli→Glu	Meduloblastoma	Giangaspero et al., 2006
			Câncer de pele	Chan et al., 1999
	GGA→AGA	Gli→Arg	Carcinoma endometrial	Mirabelli et al., 1999
	ATC→ACC	Ile→The	Adenoma de células basais	Kawahara et al., 2011
36	CAT→TAT	His→Tir	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
37			Carcinoma uterino	Fukuchi et al., 1998
			Carcinoma de endométrio	Mirabelli et al., 1999
	TCT→TGT	Ser→Cis	Meduloblastoma	Zurawel et al., 1998
			Hepatoblastoma	Koch et al., 1999
			Carcinoma de ovário	Wrigth et al., 1999
			Câncer de pele	Chan et al., 1999
	TCT→GCT	Ser→Ala	Carcinoma uterino	Fukuchi et al., 1998

			Meduloblastoma	Huang et al., 2000
	TCT→TAT	Ser→Tir	Meduloblastoma	Ellison et al., 2005
			Câncer de esôfago	Roth et al., 2005
			Carcinoma de ovário	Gamallo et al., 1999
	TCT→TTT	Ser→Fen	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
			Carcinoma endometrial	Mirabelli et al., 1999
			Câncer de pele	Chan et al., 1999
38	GGT→GAT	Gli→Asp	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
40	ACT→ATT	Tre→Ile	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
	ACC→CCC	Tre→ Pro	Adenoma de células basais	Kawahara et al., 2011
	ACC→AGC	Tre→Ser	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
	ACC→GCC	Tre→Ala	Hepatoblastoma	Koch et al., 1999
			Carcinoma uterino	Fukuchi et al., 1998
			Carcinoma de ovário	Gamallo et al., 1999
			Câncer de próstata	Voeller et al., 1998
41	ACC→GCC	Tre→Ala	Câncer de cólon retal	Samowitz et al., 1999
			Carcinoma endometrial	Mirabelli et al., 1999
			Carcinoma de célula basal	Saldanha et al., 2004
			Carcinoma de faringe	Li Zhi et al., 2004
			Carcinoma hepatocelular	Cui et al., 2003
			Carcinoma endometrial	Mirabelli et al., 1999
	ACC→ATC	Tre→Ile	Carcinoma uterino	Fukuchi et al., 1998
			Câncer de pele	Chan et al., 1999
42	ACA→ATA	Tre→Ile	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
43	GCT→GTT	Ala→Val	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
44	CCT→TCT	Pro→Ser	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
			Hepatoblastoma	Miyoshi et al., 1998
	TCT→CCT	Ser→Pro	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
			Carcinoma endometrial	Mirabelli et al., 1999
			Carcinoma uterino	Fukuchi et al., 1998
45	TCT→TTT	Ser→Fen	Hepatoblastoma	Miyoshi et al., 1998
			Câncer de cólon retal	Samowitz et al., 1999
			Carcinoma endometrial	Mirabelli et al., 1999
	TCT→TGT	Ser→Cis	Carcinoma uterino	Fukuchi et al., 1998
46	CTG→GTG	Leu→Val	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
	AGT→AAT	Ser→Asn	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
47	AGT→ACT	Ser→Tre	Carcinoma de faringe	Li Zhi et al., 2004
49	AAA→AGA	Lis→Arg	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
52	CCT→CTT	Pro→Leu	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
54	GAA→AAA	Glu→Lis	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
55	GAG→AAG	Glu→Lis	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999
58	GAT→AAT	Asp→Asn	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999

59	ACC→GCC	Tre→Ala	Câncer de esôfago	Roth et al., 2005
60	TCC→TTC	Ser→Tre	Carcinoma de tireóide	Rostan et al, 1999

## 2.7 – Sinalização canônica por Wnt em tumores de glândulas salivares

Esta seção apresenta o pouco que se conhece sobre a atuação da via canônica por Wnt na patogênese dos tumores de glândulas salivares. De forma geral, tais informações são restritas ao estudo de  $\beta$ -Catenina, e mostram que o acúmulo nuclear dessa molécula é um evento incomum, exceto em adenomas de células basais.

Zhang (2000) investigou por análise imunoistoquímica a expressão do complexo e-Caderina-Catenina em carcinomas adenóides císticos e em glândula salivar normal. Essas últimas mostraram expressão forte e estável do complexo e-Caderina-Catenina. Já nos carcinomas adenóides císticos essa expressão foi mais fraca ou até mesmo ausente. Shieh, em 2003, novamente por análise imunoistoquímica, avaliou as expressões de e, n, e p-Caderinas e de  $\alpha$ -  $\beta$ - e  $\gamma$ -Cateninas no carcinoma mucoepidermóide, observando forte expressão dessas seis moléculas no epitélio ductal normal, todavia com aumento da expressão de e-Caderina e diminuição da expressão de  $\beta$ -Catenina no tecido neoplásico. Além disso, a imunomarcação de  $\beta$ -Catenina mostrou associação significante com grau histológico, estadio clínico das lesões e sobrevida dos pacientes. Daa et al. (2004) demonstraram um caso com mutação em *CTNNB1* dentre vinte carcinomas adenóides císticos, bem como cinco desses casos, incluindo aquele com mutação em *CTNNB1*, com mutações em *AXIN1*, e ainda dois casos com mutações em *APC*.

Daa et al. (2005) observaram marcação imunoistoquímica de  $\beta$ -Catenina e de e-Caderina, em padrão membranar inconstante, em 23 casos de carcinoma adenóide cístico de glândulas salivares. Somente três desses casos apresentaram marcação nuclear de  $\beta$ -Catenina (um deles apresentando também mutação em *CTNNB1*), com outros onze exibindo marcação nuclear para Ciclina D1, nenhum dos quais associados a marcação nuclear de  $\beta$ -Catenina.

Furuse et al. (2006) observaram aumento da marcação imunoistoquímica nuclear da  $\beta$ -Catenina nas células mioepiteliais de carcinomas epiteliais-mioepiteliais. Adenomas pleomórficos, carcinomas adenóides císticos e adenocarcinomas polimorfos de baixo grau, não apresentaram tal característica. Zhou e Gao (2006) verificaram acúmulo citoplasmático e nuclear de  $\beta$ -Catenina, associado à diminuição da expressão dessa proteína na membrana celular, na maioria de casos de carcinomas adenóides císticos metastáticos.

Do Prado et al. (2006) observaram marcação imunoistoquímica constante em padrão membranar e citoplasmático de  $\beta$ -Catenina em glândulas salivares normais, adenomas pleomórficos e em carcinomas ex-adenomas pleomórfico. Shiratsuchi et al. (2007) observaram marcação imunoistoquímica em padrão nuclear / citoplasmático de  $\beta$ -Catenina em seis de 44 casos de carcinomas mucoepidermóides, cinco dos quais eram de alto grau de malignidade, quatro dos quais apresentavam também mutações pontuais em *CTNNB1*. O acúmulo nuclear de  $\beta$ -Catenina foi significativamente associado com prognóstico adverso ( $p=0,011$ ). Duas alterações no gene *APC* foram ainda detectadas em dois casos de baixo grau, os quais não apresentavam acúmulo nuclear de  $\beta$ -Catenina.

Genelhu et al. (2007), observaram rara marcação imunoistoquímica nuclear de  $\beta$ -Catenina em carcinomas ex-adenomas pleomórficos e em um caso dentre dez adenomas pleomórficos.

Queimado et al. (2008) observaram expressão de *Wif1* em glândulas salivares normais, com significativa redução em linhagens celulares de adenomas pleomórficos, 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  $\beta$ -Catenina foi identificado nas células tumorais, havendo ainda correlação positiva entre a expressão de  $\beta$ -Catenina e *PLAG1*. Esse foi o primeiro estudo mostrando inibição de um antagonista da via canônica de *Wnt*

– Wif1 –, bem como aumento da expressão de um agonista – Wnt1 –, em células tumorais de glândula salivar.

Chandrashekhar et al. (2009) observaram marcação imunoistoquímica citoplasmática de  $\beta$ -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.

Ferrazzo et al. (2009) observaram marcação nuclear de Galectina-3 em carcinomas adenóides císticos, e citoplasmática em adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade. Ambos os tumores mostraram marcação citoplasmática ou nuclear intensa para  $\beta$ -Catenina na maioria dos casos. Imunorreatividade para ciclina D1 foi raramente detectada nos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau, mas comum nos carcinomas adenoides císticos.

## **2.8 –Sinalização canônica por Wnt na patogênese do adenoma de células basais e do adenocarcinoma de células basais de glândulas salivares**

do Prado et al. (2007), descreveram pela primeira vez a localização nuclear de  $\beta$ -Catenina em adenomas de células basais, relacionando tal achado com uma possível explicação para o surgimento dessa doença. Alguns anos se passaram até que Kawahara et al. (2011), descrevessem o mesmo achado em 21 casos dentre 22 adenomas de células basais. Adicionalmente, relataram que onze casos (52%) apresentavam mutações no gene *CTNNB1*, localizadas nos códons I35T e T41P. Esses mesmo autores propuseram que a alta expressão nuclear de  $\beta$ -Catenina (acima de 30%) era encontrada apenas em adenomas de células basais, sendo assim uma importante ferramenta de diagnóstico diferencial. Não são conhecidas informações a respeito da expressão de outras moléculas da via Wnt/  $\beta$ -Catenina em adenomas e adenocarcinomas de células basais

### 3 - Proposição e hipóteses

---

Este estudo buscou melhorar o entendimento da patologia molecular do adenoma de células basais e do adenocarcinoma de células basais de glândulas salivares, com interesse específico na via de sinalização Wnt, mediante a avaliação da expressão das proteínas  $\beta$ -Catenina, Wnt1 e c-Myc por técnica imunoistoquímica.

Para tanto, foram testadas as seguintes hipóteses:

- i.  $\beta$ -Catenina é expressa em padrão nuclear na maioria dos adenomas de células basais.
- ii. Essa expressão, quando em tumores com diferenciação tubular, ocorre predominantemente nas células abluminais.
- iii. A expressão nuclear de  $\beta$ -Catenina é associada à expressão de Wnt1.
- iv. A expressão nuclear de  $\beta$ -Catenina é associada à expressão de c-Myc.
- v. A expressão nuclear de  $\beta$ -Catenina varia conforme características clínicas e patológicas do adenoma de células basais.
- vi. Existe diferença no padrão de expressão de  $\beta$ -Catenina entre o adenoma de células basais e o adenocarcinoma de células basais.

## 4 - Metodologia

---

### 4. 1 Casuística, amostras e informações de interesse

Este estudo abordou uma casuística retrospectiva, composta por pacientes atendidos entre os anos de 1997 e 2006 no Instituto Nacional de Câncer (INCA).

Quanto à seleção dos casos de interesse, foram incluídos todos aqueles diagnosticados por exame anatomo-patológico como adenomas de células basais ou adenocarcinomas de células basais, conforme os critérios mais recentes da Organização Mundial da Saúde (Araújo, 2005; Ellis, 2005). Em seguida, foram excluídos aqueles que não apresentavam material biológico arquivado em quantidade suficiente para as reações imunoistoquímicas, finalizando-se com uma casuística de 28 adenomas de células basais, sendo dois desses casos que se apresentaram como recidivas, e de quatro adenocarcinomas de células basais.

Para caracterização sociodemográfica e clinicopatológica da amostra, bem como para análise posterior, dados pertinentes foram levantados a partir de registros de prontuários médicos. Foram coletados dados referentes à idade e sexo dos pacientes, bem como localização do tumor primário, sua dimensão, tempo de sintomas, existência de metástases, história pregressa de múltiplos tumores de pele, regionais ou distantes, tratamento e tempo de acompanhamento.

### 4.2 Imunoistoquímica

Para cada um dos casos selecionados, foram recuperados os blocos de parafina contendo amostras teciduais provenientes da exérese das respectivas lesões, as quais haviam sido previamente fixadas em formalina a 10%. Nas situações em que houvesse disponível mais de um bloco para cada caso,

selecionou-se aquele que apresentasse a maior quantidade de neoplasia. De cada bloco assim selecionado, foram então confeccionados cortes histológicos de 3 $\mu$ m de espessura, os quais foram colocados em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropiltrióxilosilano.

Em seguida, cada caso foi submetido a ensaios imunoistoquímicos para detecção individual dos抗ígenos Wnt1,  $\beta$ -Catenina e c-Myc, utilizando-se para tal os anticorpos policlonais descritos no Quadro 3, conforme padronização laboratorial prévia.

Quadro 3 – Características dos anticorpos policlonais empregados nos ensaios imunoistoquímicas do presente estudo (todos fabricados por Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).

Especificidade	Código	Fonte do anticorpo	Título
Wnt1	SC-6280	Ovelha	1:500
$\beta$ -Catenina	SC-7199	Coelho	1:500
c-Myc	SC-788	Coelho	1:100

Para tanto, os cortes teciduais foram inicialmente desparafinados em xanol e hidratados em etanol acrescido de quantidades crescentes de água.

Em seguida, procedeu-se com recuperação antigênica com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 1mM) tamponado com hidróxido de sódio (pH 8,0), durante submetidos três ciclos de cinco minutos cada, em forno de microondas à potência máxima. Após resfriamento e lavagem em água destilada, foi feito o bloqueio de atividade endógena de peroxidase com peróxido de hidrogênio a 10V, durante dois banhos de 15 minutos cada, seguindo-se 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), e em seguida incubados com o anticorpo primário diluído em TRIS-HCl no título anteriormente especificado, por 18 horas a 4°C. Após lavagem em TRIS-HCl, procedeu-se à amplificação

da reação com sistema de estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB+, Dako, Carpinteria, CA, EUA), consistindo em incubação por 30 minutos à temperatura ambiente em solução com anticorpo secundário biotinilado, lavagem em solução de TRIS-HCl, e incubação novamente por 30 minutos à temperatura ambiente em solução de estreptavidina conjugada a peroxidase.

Finalmente, após nova lavagem em TRIS-HCl, a reação foi revelada com a imersão dos cortes histológicos em solução aquosa de 3,3'-tetrahidrocloreto de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio, por três minutos, com precipitação resultante do pigmento oxidado, seguindo-se por contracoloração com hematoxilina de Harris.

Cortes histológicos de carcinoma ductal invasivo de mama com reatividade reconhecida para Wnt1,  $\beta$ -Catenina e c-Myc foram utilizados como controle positivo, e a omissão dos anticorpos primários foi empregada como controle negativo para cada ensaio.

#### **4.3 - Análise da imunomarcação**

Cada lâmina submetida a ensaio imunoistoquímico foi inicialmente avaliada de forma qualitativa quanto à presença ou não de marcação, quanto à sua compartmentalização predominante (membranar, citoplasmática e, ou, nuclear), quanto à distribuição da marcação nos diferentes tipos celulares (basalóide, luminal ou abluminal quando formações tubulares estivessem presentes), e quanto à distribuição da marcação nos diferentes padrões arquiteturais existentes em cada amostra. Em seguida, a partir do método de análise descrito por Kawahara et al. 2011 (modificado) foram estimadas a intensidade predominante de marcação (discreta, moderada ou intensa), a quantidade de células positivas para cada amostra (as quais foram classificadas considerando-se os limites de 30%, 50% e 75%) e então, dentre as células positivas, a proporção isolada de células com marcação nuclear (considerando-se os mesmos limites descritos para o parâmetro anterior). Outro método de avaliação foi também utilizado, designado como Quickscore,

e foi definido como o resultado da multiplicação do parâmetro intensidade pelo parâmetro proporção de células positivas (DETRE et al., 1995).

Tabela 1 – Variáveis observadas para a avaliação da coloração imunoistoquímica de Wnt1,  $\beta$ -Catenina e c-Myc em adenoma de células basais e adenocarcinoma de células basais das glândulas salivares.

Variáveis	Classes				
	0	1	2	3	4
Proporção de células neoplásicas positivas (PPC)		Até 30% de células positivas	30 à 50% de células positivas	50 à 75% de células positivas	Mais de 75% de células positivas
Intensidade da coloração (IS)		Fraca	Moderada	Forte	-
	Amostras totalmente negativas				
Compartimento celular predominante (CC)		Positividade citoplasmática	Positividade nuclear e citoplasmática	Positividade nuclear	-
Proporção de células com positividade nuclear (PN)*		Até 30% de células positivas	30 à 50% de células positivas	50 à 75% de células positivas	Mais de 75% de células positivas
Quickscore (QI)	PPC X IS				

\* Feito apenas para  $\beta$ -Catenina.

#### 4.4 Avaliação estatística

Todas as análises estatísticas foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para todas as análises propostas, a hipótese de nulidade foi rejeitada quando os valores de  $p$  foram menores que 0,05.

Estatística descritiva foi empregada para caracterizar a amostra nas diferentes variáveis estudadas, considerando média, desvio padrão e frequências relativas dadas em percentuais. Todas as análises foram precedidas da realização do teste de normalidade de D'Agostino e Pearson, conforme orientação do software estatístico mencionado. As variáveis quantitativas (idade, tempo de queixa, tamanho dos tumores, escores de marcação) foram analisadas utilizando o teste t de Student para dados paramétricos e o Mann-Whitney para dados não paramétricos, quando da comparação entre dois grupos independentes. Correlação entre variáveis foram avaliadas segundo a normalidade dos dados, considerando os testes de Spearman e de Pearson. Variáveis categóricas foram comparadas pelo teste Exato de Fisher ou do Qui-quadrado, sempre considerando a opção dada pelo software de análise.

## 5 - Resultados

---

Imagens representativas da expressão de Wnt1,  $\beta$ -Catenina e c-Myc em adenoma de células basais e em adenocarcinoma de células basais são apresentadas nas Figuras 1 e 2.

As glândulas salivares normais adjacentes aos tumores expressaram  $\beta$ -Catenina em padrão membranáceo e citoplasmático nas células ductais em todos os casos. Estas mesmas células foram negativas para Wnt1 e c-Myc.

Para os adenomas de células basais com diferenciação tubular, observou-se marcação nuclear de  $\beta$ -Catenina restrita à camada abluminal, com células luminais permanecendo negativas. Para Wnt1 e c-Myc, as células neoplásicas positivas se distribuíam aleatoriamente, independentemente da diferenciação celular. Nos adenoma de células basais que apresentavam padrão histológico sólido e trabecular, padrão em mosaico de marcação foi frequentemente observado para todos os anticorpos.

Nos adenocarcinoma de células basais este mesmo padrão aleatório foi evidenciado em todos os casos.

Os dados provenientes da análise semiquantitativa dos casos de adenoma de células basais estão individualmente apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1 – Dados clínico-patológicos e resultados da análise semi-quantitativa nos adenomas de células basais.**

Caso	Características clínico-patológicas				<i>Wnt1</i>				<i>β-Catenin</i>				<i>c-Myc</i>				
	Idade	Sexo	Subtipo	Degeneração Cística	PPC	IS	CC	QI	PPC	IS	CC	N	QI	PPC	IS	CC	QI
1	66	M	Sólido	Não	0	0	0	0	3	2	3	3	6	0	0	0	0
2*	86	F	Sólido	Não	3	3	1	9	4	1	1	1	4	4	3	1	12
3	63	F	Sólido	Não	1	1	1	1	3	3	2	2	9	1	1	1	1
4	79	F	Sólido	Não	1	1	1	1	4	3	3	3	12	1	1	1	1
5	86	F	Tubular	Não	0	0	0	0	3	3	2	2	9	0	0	0	0
6	84	M	Trabecular	Não	0	0	0	0	4	3	1	1	12	3	1	1	3
7	42	F	Trabecular	Sim	0	0	0	0	2	1	3	2	2	0	0	0	0
8	78	M	Tubular	Não	0	0	0	0	3	2	1	1	6	0	0	0	0
9	47	F	Trabecular	Não	0	0	0	0	4	3	1	2	12	2	1	1	2
10	48	F	Sólido	Não	0	0	0	0	2	1	3	2	2	0	0	0	0
11	54	F	Trabecular	Não	0	0	0	0	3	2	3	3	6	2	1	1	2
12	67	F	Trabecular	Não	0	0	0	0	4	3	3	3	12	3	1	1	3
13	53	F	Trabecular	Não	0	0	0	0	4	3	3	3	12	4	2	1	8
14	79	M	Trabecular	Sim	0	0	0	0	1	1	3	1	1	1	1	1	1
15	60	M	Sólido	Não	0	0	0	0	3	3	1	3	9	4	2	1	8
16	67	F	Trabecular	Não	0	0	0	0	3	3	2	3	9	1	1	1	1
17	73	M	Sólido	Sim	0	0	0	0	3	2	3	3	6	0	0	0	0
18	44	M	Trabecular	Não	1	1	1	1	2	2	2	2	4	0	0	0	0
19	53	F	Trabecular	Não	1	1	1	1	1	1	1	0	1	4	2	1	8
20	83	F	Trabecular	Não	2	1	1	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0
21	68	M	Sólido	Não	1	1	1	1	4	3	2	3	12	4	1	1	4
22*	67	F	Sólido	Não	3	1	1	3	3	2	1	1	6	4	2	1	8
23	42	F	Sólido	Não	1	1	1	1	2	2	2	2	4	3	1	1	3
24	73	F	Sólido	Não	1	1	1	1	4	3	2	2	12	1	1	1	1
25	84	F	Tubular	Não	1	1	1	1	3	2	1	1	6	1	2	1	2
26	79	M	Sólido	Não	1	1	1	1	3	2	2	3	6	1	1	1	1
27	48	F	Sólido	Não	3	1	1	3	3	3	3	3	9	3	1	1	3
28	48	F	Sólido	Não	1	1	1	1	3	3	3	3	9	1	1	1	1

F – Feminino. M – Masculino. PPC – Proporção de células positivas IS – Intensidade da coloração. CC – Compartimento celular. QI – Quick-score index.

\* Casos recorrentes.

Nos adenoma de células basais, observou-se positividade para Wnt1 em metade dos casos, na forma de marcação citoplasmática de fraca intensidade e quase sempre em reduzida proporção das células tumorais. Positividade nuclear de  $\beta$ -Catenina estava presente em todos os tumores, exceto em um caso que mostrou marcação apenas citoplasmática, e esse padrão nuclear foi prevalente em 67,9% dos casos. Positividade para Wnt1 não se mostrou associada à expressão nuclear de  $\beta$ -Catenina ( $p = 0,70$ , teste exato de Fisher), nem à proporção de células que expressavam  $\beta$ -Catenina ( $p = 1,0$ , teste exato de Fisher). Positividade para c-Myc foi encontrada em 71,4% dos casos, em padrão apenas citoplasmático, geralmente de fraca intensidade, e em proporção variada de células neoplásicas. Mais uma vez, a positividade para c-Myc não se mostrou associada com a expressão nuclear de  $\beta$ -Catenina ( $p = 1,0$ , teste exato de Fisher), nem com a proporção de células que expressam  $\beta$ -Catenina ( $p = 1,0$ , teste exato de Fisher). Da mesma maneira, o Quickscore para  $\beta$ -Catenina não se correlacionou com os de Wnt1 ou c-Myc ( $p = 0,42$  ou  $p = 0,15$ , respectivamente, teste de correlação de Spearman). Segregação dos casos de acordo com a expressão  $\beta$ -Catenina (nuclear ou não) não se associou com o sexo ( $p = 1,0$ , teste exato de Fisher), idade ( $p = 0,14$ , teste de Mann-Whitney), subtipo histológico ( $p = 0,42$ , teste exato de Fisher), ou presença degeneração cística ( $p = 0,53$ , teste exato de Fisher). Os dois casos de adenoma de células basais recorrentes apresentaram alto índice de Quickscore para Wnt1 e c-Myc, embora não tenha sido possível avaliar estatisticamente esse resultado devido ao número restrito de casos. Nos casos de adenocarcinoma de células basais, expressão nuclear de  $\beta$ -Catenina foi evidenciada apenas no citoplasma. Wnt1 e c-Myc foram fracamente expressas no citoplasmadas células neoplásicas em três dos quatro casos. Dados dos casos são apresentados individualmente na Tabela 2.

Tabela 3 – Dados clínico-patológicos e resultados da análise semi-quantitativa nos adenocarcinomas de células basais.

Caso	Características Clinicopatológicas			Wnt1				β-Catenin				c-Myc			
	Idade	Sexo	PPC	IS	CC	QI	PPC	IS	CC	QI	PPC	IS	CC	QI	
1	66	M	0	0	0	0	4	2	1	8	0	0	0	0	
2	86	F	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	
3	63	F	1	1	1	1	3	3	1	9	4	1	1	4	
4	79	F	1	1	1	1	4	3	1	12	4	2	1	8	

F – Feminino. M – Masculino. PPC – Proporção de células positivas IS – Intensidade da coloração. CC – Compartimento celular. QI – Quick-score index.

Figura 1: A: Expressão difusa citoplasmática de Wnt1 em adenoma de células basais (400 X); B: Expressão nuclear de  $\beta$ -Catenina em células basaloides abluminais (mioepiteliais) em adenoma de células basais (400 X); C: Expressão citoplasmática difusa de c-Myc em adenoma de células basais (400 X). Técnica imunoistoquímica por estreptavidina-biotina-peroxidase.

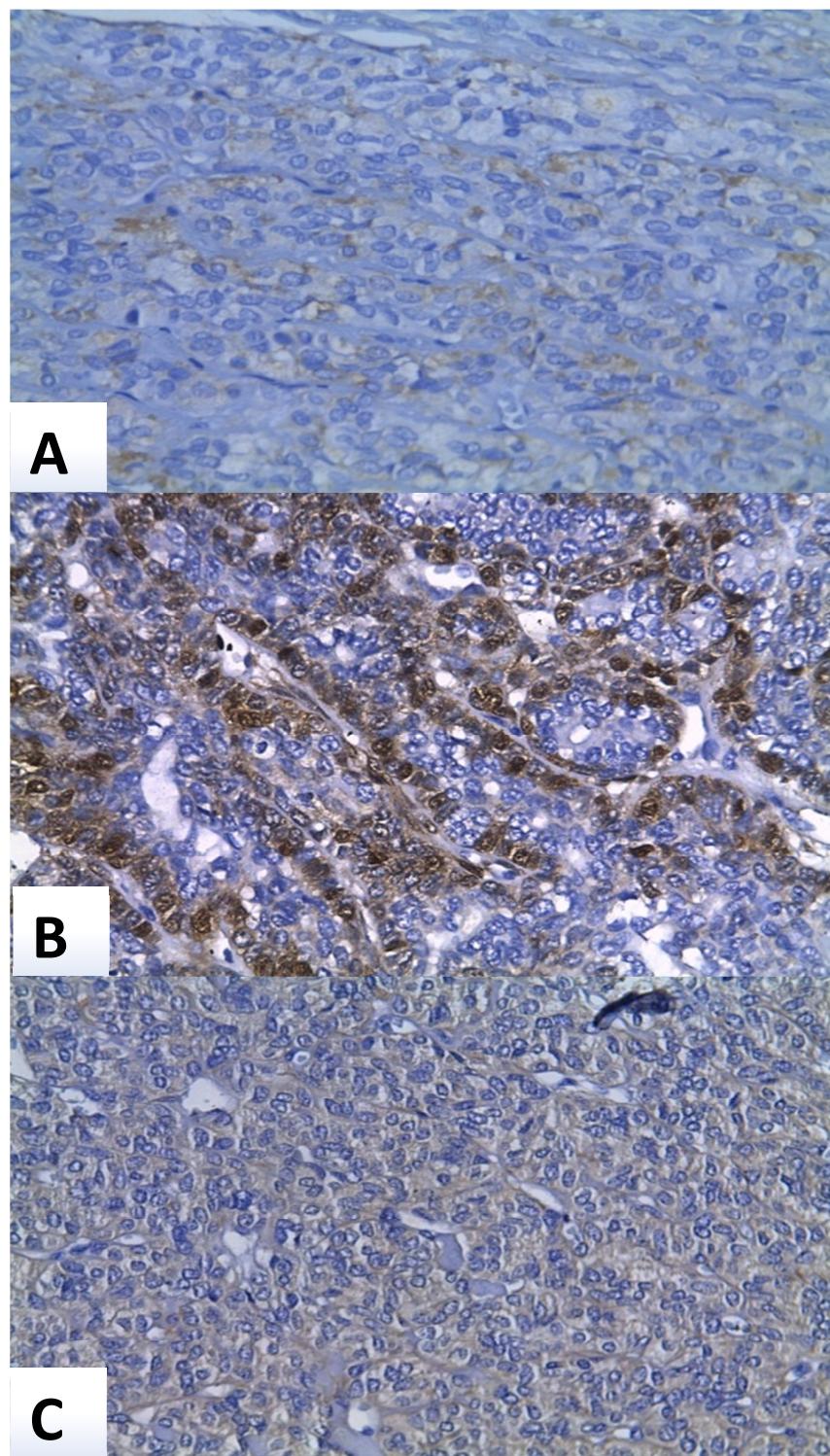
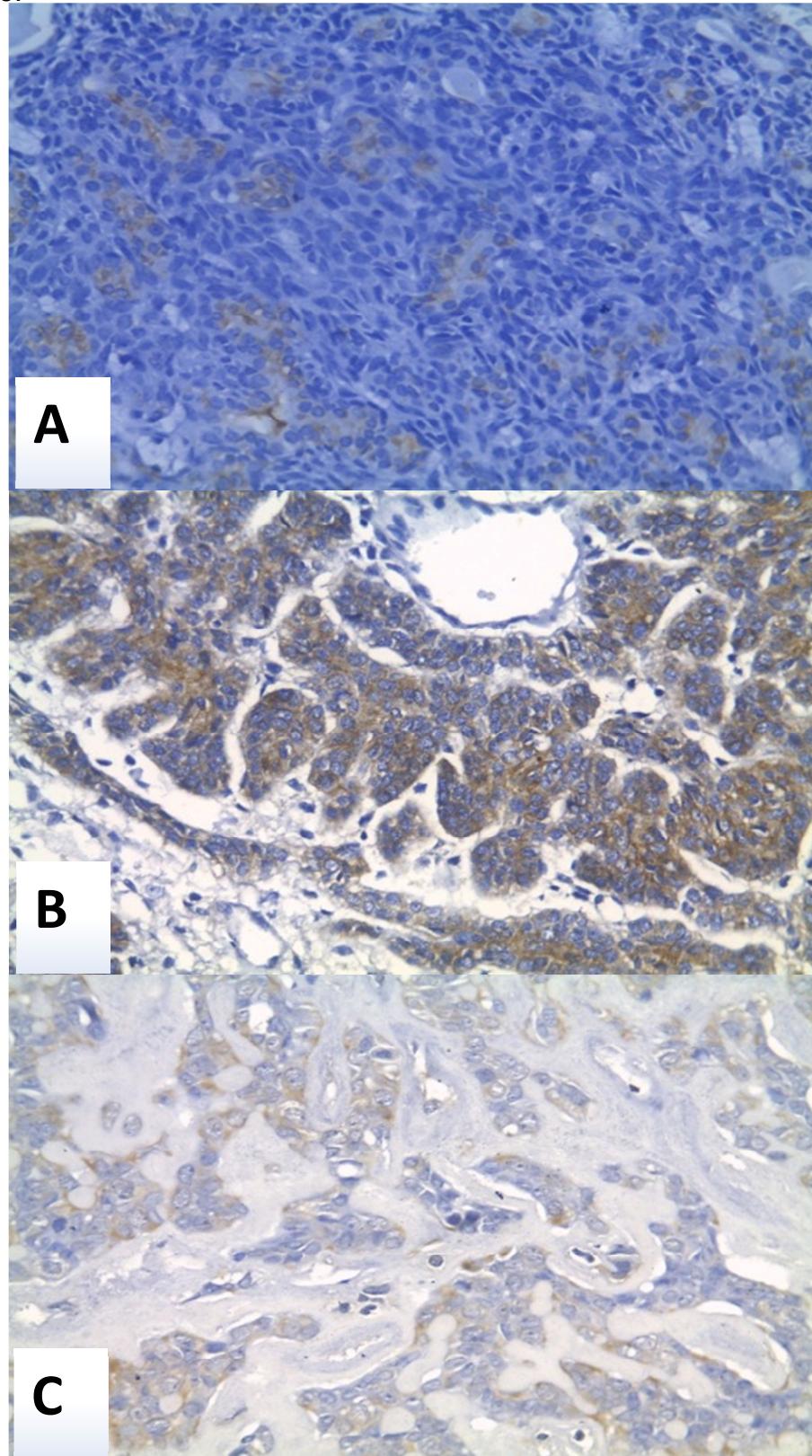


Figura 2: A) Expressão difusa citoplasmática de Wnt1 em um pequeno número de células de adenocarcinoma de células basais (400 X); B: Expressão difusa citoplasmática em adenocarcinoma de células basais (400 X); C: Expressão citoplasmática fraca de c-Myc em adenocarcinoma de células basais (400 X). Técnica imunoistoquímica por esteptavidina-biotina-peroxidase.



## 6 - Discussão

---

Este estudo foi proposto em face das descrições anteriores de que a expressão nuclear da  $\beta$ -Catenina é frequente encontrada em adenoma de células basais (Kawahara et al., 2011). Foi evidenciado que 96,4% dos casos de adenoma de células basais demonstram alguma positividade nuclear de  $\beta$ -catenina, embora essa tenha sido a marcação predominante em apenas 67,9% deles. Em células normais,  $\beta$ -Catenina é destruída pela fosforilação dos resíduos de N-terminal Ser33, Thr41 e Ser45 em um complexo de destruição multimolecular citoplasmática (proteossoma). No entanto, em pelo menos em cinco situações, a  $\beta$ -Catenina pode se manter estável, na sua forma hipofosforilada sendo assim possível seu acúmulo e translocação nuclear: 1) ativação da via Wnt/  $\beta$ -Catenina ("canônica"), quando existe interação de ligantes como Wnt1 a receptores e co-receptores de membrana levando à destruição do complexo de degradação da  $\beta$ -Catenina; 2) mutações inativadoras da proteína Wif, as quais levariam à maior disponibilidade de Wnt, dessa forma uma maior ativação de toda a via; 3) mutações dos resíduos N-terminal no gene *CTNNB1*; 4) mutações inativadoras em genes relacionados à destruição  $\beta$ -Catenina (como APC) (Mosimann, Hausmann e Basler, 2009); e 5). Ativação da proteína AKT pode estabilizar a  $\beta$ -Catenina através da inibição da proteína GSK-3 $\beta$  ou diretamente a fosforilando, 6) Cross talk com a via de sinalização do EGFR. Embora tais possíveis associações devam ainda ser avaliadas nos ACB e ACCB.

Mutações pontuais no gene *CTNNB1* têm sido relatadas em adenoma de células basais, em apenas metade dos casos que apresentam positividade nuclear de  $\beta$ -Catenina (Kawahara et al., 2011) e ainda não está suficientemente claro se a mais frequente dessas mutações (translocação no resíduo I35) levaria a estabilização da  $\beta$ -Catenina, por impedir seu reconhecimento e degradação ou mesmo leva a uma perda ou ganho de função.

Há evidências experimentais de que aumento de Wnt1 está associado a tumores de glândulas salivares (Polakis, 2007; Tsukamoto et al., 1988;

Queimado et al., 1999; Daa et al., 2004; Queimado et al., 2007), mas a expressão de Wnt1 ainda não havia sido investigada em adenoma de células basais. Neste sentido, consideramos se a expressão de Wnt1 estaria relacionada à localização nuclear de  $\beta$ -Catenina nessas lesões, mas os resultados atuais não apoiam a participação da via Wnt “canônica” na patogênese deste tumor. Outras investigações devem ser realizadas para averiguar a presença de outras moléculas dessa via de sinalização Wnt no adenoma de células basais, como por exemplo: Wnt3, Wnt8, Frizzled, APC, GSK-3 $\beta$ , axina1 e ciclina D1.

Como visto anteriormente o acúmulo de  $\beta$ -Catenina no núcleo pode ser forçados por caminhos diferentes; todavia os efeitos desta alteração também são variados. Quando translocado para o núcleo, a  $\beta$ -Catenina coativa fatores de transcrição como o TCF/LEF que transcreve genes envolvidos em diversos processos celulares, como apoptose, progressão do ciclo celular, crescimento celular e replicação do DNA.

O gene *CCND1* codifica a proteína ciclina D1, e é um dos genes induzidos pela ativação da via Wnt/  $\beta$ -Catenina, embora existam evidências de que a expressão da Ciclina D1 seja independente do acúmulo nuclear de  $\beta$ -Catenina em tumores de glândulas salivares (Daa et al., 2004). c-Myc é outro gene controlado pela  $\beta$ -Catenina. A proteína c-Myc é um fator de transcrição que regula a expressão de até 15% dos genes humanos, e para ser relevante na patogênese de vários tipos de câncer, por exemplo: câncer colorretal, pulmão e pâncreas, onde superexpressão de c-Myc pode ser conduzido pela amplificação da via de sinalização Wnt /  $\beta$ -Catenina (Myant e Sansom, 2011). Assim, questionamos se o acúmulo nuclear de  $\beta$ -Catenina nos adenoma de células basais poderia estar associado com maior expressão de c-Myc, mas nossos resultados não dão suporte a essa hipótese.

Dois outros achados também merecem alguns comentários: 1) Nos casos de adenoma de células basais com diferenciação tubular, apenas as células com fenótipo mioepitelial apresentaram marcação nuclear de  $\beta$ -Catenina, apoiando a associação deste fenótipo com patogênese dessa doença como proposto por Kawahara et al. (2011); e 2) Curiosamente, um alto QI para Wnt1 e c-Myc foi

observados nos dois casos recorrentes de adenoma de células basais, embora exista uma evidência de participação destas moléculas na evolução e no comportamento do adenoma de células basais, qualquer conclusão a respeito é restringida por limitações analíticas.

A imunomarcação de Wnt1,  $\beta$ -Catenina e c-Myc neste trabalho não se correlacionaram com nenhuma das variáveis clínico-patológicas estudadas, fato este também observado por Kawahara et al., (2011). A princípio, as causas do adenoma de células basais aparentam não estar associadas a estes fatores.

Finalmente, nenhum dos casos de adenocarcinoma de células basais apresentou expressão nuclear significativa de  $\beta$ -Catenina. Estudo prévio por Kawahara et al. (2011) observaram expressão baixa de  $\beta$ -Catenina nuclear em um dos três casos destes tumores analisados. Estes resultados sugerem que essa marcação não é tão comum nos adenocarcinoma de células basais como no adenoma de células basais, desta forma mais estudos devem ser realizados para evidenciar se tal dado pode ser utilizado como ferramenta de diagnóstico diferencial entre essas lesões, facilitando seu diagnóstico principalmente em biopsias pequenas onde a invasão dos tecidos periglandulares não pode ser observada nos casos de adenocarcinoma de células basais.

Finalmente, é necessário lembrar que o estudo da expressão molecular imunoistoquímica está condicionado com processamento do material, padronização laboratorial e critérios de análise, devendo tais dados aqui apresentados serem avaliados com parcimônia.

## 7 - Conclusão

---

Em conclusão, este é o primeiro estudo a examinar possível associação de Wnt1a,  $\beta$ -Catenina e c-Myc em adenoma de células basais e adenocarcinoma de células basais de glândulas salivares. Nossos dados corroboram o frequente acúmulo nuclear de  $\beta$ -Catenina nos adenoma de células basais, mas as causas e implicações deste achado permanecem incertas, já que os resultados atuais não comprovam a indução deste fenótipo através de Wnt1, nem a ativação da proteína c-Myc de forma consequente neste tumor. A expressão nuclear de  $\beta$ -Catenina não variou conforme características clínicas e patológicas do adenoma de células basais

Outras vias podem levar a estabilização da  $\beta$ -Catenina e devem ser exploradas para fornecer uma melhor compreensão da patogênese do adenoma de células basais. De qualquer forma, é plausível para investigar a associação da via Wnt/ $\beta$ -Catenina com a diferenciação mioepitelial e recorrências neste tumor. A diferença no acúmulo nuclear de  $\beta$  Catenina entre adenoma de células basais e adenocarcinoma de células basais parece ser uma importante ferramenta útil para diferenciar essas condições, porem mais pesquisas adicionais são necessárias para confirmar esta possibilidade.

## 8 - Referências

---

- Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S, et al. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. **Nature**. 1985; 318(6046): 533-8.
- Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. **Cytokine Growth Factor Rev**. 2000; 11(4): 273-82.
- Baksh D, Boland GM, Tuan RS. Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation. **J Cell Biochem**. 2007; 101(5): 1109-24.
- 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
- Barth AI, Näthke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. **Curr Opin Cell Biol**. 1997; 9(5): 683-90.
- Bova R, Saylor A, Coman WB. Parotidectomy: review of treatment and outcomes. **ANZ J Surg**. 2004; 74(7): 563-568.
- Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E. A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. **Nat Genet**. 1999; 21(4): 410-3.
- Chandrashekhar C, Angadi PV, Krishnapillai R.  $\beta$ -Catenin expression in benign and malignant salivary gland tumors. **Int J Surg Pathol**. 2011; 19: 433-40.
- Cohen MM Jr. The hedgehog signaling network. **Am J Med Genet A**. 2003; 123A(1): 5-28.
- Cordeiro MS. **Adenoma de células basais no Instituto Nacional de Câncer: experiência recente com 30 casos**. [Dissertação] Uberlândia: Faculdade de Odontologia/UFU; 2010.

Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. **J Gastroenterol Hepatol.** 2003; 18(3): 280-7.

Daa T, Kaku N, Kashima K, Nakayama I, Yokoyama S. Expression of beta-catenin, E-cadherin and cyclin D1 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. **J Exp Clin Cancer Res.** 2005; 24: 83-7.

Daa T, Kashima K, Kaku N, Suzuki M, Yokoyama S. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in adenoid cystic carcinoma. **Mod Pathol.** 2004; 17: 1475-82.

de 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. p 261-2.

Detre S, SaclaniJotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **J Clin Pathol.** 1995; 48: 876-8.

do Prado RF, Cardoso CL, Consolaro A, de Assis Taveira LA. Nuclear beta-catenin in basal cell adenomas. **Int J SurgPathol.** 2007; 15: 219-20.

Doucas H, Garcea G, Neal CP, Manson MM, Berry DP. Changes in the Wnt signalling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance. **Eur J Cancer.** 2005; 41(3): 365-79.

Ellis G, VC. Basal cell adenocarcinoma. 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. 229-2.

Ellis GL, Auclair PL. Tumors of the salivary glands. **AFIP atlas of tumor pathology**, 4th series, fascicle 9. Silver Spring MD: ARP Press; 2008.

Ellis GL, Wiscovitch JG. Basal cell adenocarcinomas of the major salivary glands. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1990; 69(4): 461-9.

Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, Lusher ME, Weston CL, Taylor RE, Pearson AD, Clifford SC; United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. **J Clin Oncol.** 2005; 23(31): 7951-7.

Espada J, Calvo MB, Díaz-Prado S, Medina V. Wnt signalling and cancer stem cells. **Clin Transl Oncol.** 2009; 11: 411-27

Eveson JW, Auclair P, Gnepp DR, El-Naggar AK. 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.

Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. **J Biol Chem.** 2007; 282(15): 11221-9.

Ferrazzo KL. Estudo da expressão imunoistoquímica da proteína galectina-3 associada à  $\beta$ -catenina e ciclina D1 em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares. [Tese] São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2008.

Fonseca I, Fonseca R, Martins C, Soares J. Alteration of beta-catenin localization in salivary pleomorphic adenomas is not related to t(3;8)(p21;q12) and is mainly present in nonepithelial cell types. **Histopathology.** 2008; 52: 244-7.

Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S. Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. **Cancer Res.** 1998; 58(16): 3526-8.

Furuse C, Cury PR, Altemani A, et al. Beta-catenin and E-cadherin expression in salivary gland tumors. **Int J Surg Pathol.** 2006; 14: 212-7.

Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suárez A, Armas A. betacatenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas relationship

with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. **Am J Pathol.** 1999; 155(2): 527-36.

Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG, Carcangiu ML, Rimm DL. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. **Cancer Res.** 1999; 59(8): 1811-5.

Genelhu MC, Gobbi H, Arantes DC, Cardoso SV, Cassali GD. Immunolocalization of beta-catenin in pleomorphic adenomas and carcinomas ex-pleomorphic adenomas of salivary glands. **Appl Immunohistochem Mol Morphol.** 2007; 15: 273-8.

Giangaspero F, Wellek S, Masuoka J, Gessi M, Kleihues P, Ohgaki H. Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading. **Acta Neuropathol.** 2006; 112(1): 5-12.

Hai B, Yang Z, Millar SE, Choi YS, Taketo MM, Nagy A, et al. Wnt/β-catenin signaling regulates postnatal development and regeneration of the salivary gland. **Stem Cells Dev.** 2010; 19:1793-801.

Harris KE, Beckendorf SK. Different Wnt signals act through the Frizzled and RYK receptors during Drosophila salivary gland migration. **Development.** 2007; 134(11): 2017-25.

Huang H, Mahler-Araujo BM, Sankila A, Chimelli L, Yonekawa Y, Kleihues P, et al. APC mutations in sporadic medulloblastomas. **Am J Pathol.** 2000; 156(2): 433-7.

Ito FA, Ito K, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2005; 34(5): 533-6.

Kalluf, GH. **Neoplasias epiteliais de glândulas salivares: estudo retrospectivo de 732 casos diagnosticados no Instituto Nacional do Câncer (INCAMS).** [Dissertação] Uberlândia: Faculdade de Odontologia/UFU, 2006.

Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). **Oncol Rep.** 2005; 14(6): 1583-8.

Kawahara A, Harada H, Abe H, Yamaguchi T, Taira T, Nakashima K, et al. Nuclear  $\beta$ -catenin expression in basal cell adenomas of salivary gland. **J Oral Pathol Med.** 2011; 40: 460-6.

Kleinsasser O, Klein HJ. Basalzelladenome der Speicheldrüsen. **Archiv Klin. Exper. Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilk.** 1967; 189: 302-16.

Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. **Cancer Res.** 1999; 59(2): 269-73.

Li Z, Ren Y, Lin SX, Liang YJ, Liang HZ. Association of E-cadherin and beta-catenin with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. **Chin Med J (Engl).** 2004; 117(8): 1232-9.

Lin C, Fisher AV, Yin Y, Maruyama T, Veith GM, Dhandha M, Huang GJ, Hsu W, Ma L. The inductive role of Wnt- $\beta$ -Catenin signaling in the formation of oral apparatus. **Dev Biol.** 2011; 356(1): 40-50.

Lucero OM, Dawson DW, Moon RT, Chien AJ. A re-evaluation of the "oncogenic" nature of Wnt/beta-catenin signaling in melanoma and other cancers. **Curr Oncol Rep.** 2010; 12: 314-8.

Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri C, Dale D, Holowaty E, et al. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. **Cancer Res.** 1999; 59(14): 3346-51.

Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, et al. Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. **Cancer Res.** 1998; 58(12): 2524-7.

Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Beta-catenin hits chromatin: regulation of Wnt target gene activation. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2009; 10: 276-86.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. **Science**. 1997; 275(5307): 1787-90.

Myant K, Sansom OJ. Wnt/Myc interactions in intestinal cancer: Partners in crime. **Exp Cell Res** 2011.

Nagao K, Matsuzaki O, Saiga H, Sugano I, Shigematsu H, Kaneko T, et al. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. **Science**. 2004; 303(5663): 1483-7.

Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. **Cell**. 1982; 31: 99-109.

Owens OT, Calcaterra TC. Salivary gland tumors of the lip. **Arch Otolaryngol**. 1982; 108: 45-47.

Park WS, Oh RR, Park JY, Lee SH, Shin MS, Kim YS, et al. Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. **Cancer Res**. 1999; 59(17): 4257-60.

Patel N, Sharpe PT, Miletich I. Coordination of epithelial branching and salivary gland lumen formation by Wnt and FGF signals. **Dev Biol**. 2011; 358(1): 156-67.

Pinkston JA, Cole P. Incidence rates of salivary gland tumors: results from a population-based study. **Otolaryngol Head Neck Surg**. 1999; 120: 834-40.

Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. **Curr Opin Genet Dev**. 2007; 17: 45-51.

Ponti G, Losi L, Pellacani G, Rossi GB, Presutti L, Mattioli F, et al. Wnt pathway, angiogenetic and hormonal markers in sporadic and familial adenomatous polyposis-associated juvenile nasopharyngeal angiofibromas (JNA). **Appl Immunohistochem Mol Morphol**. 2008; 16(2): 173-8

Queimado L, Lopes C, Du F, Martins C, Bowcock AM, Soares J, et al. Pleomorphic adenoma gene 1 is expressed in cultured benign and malignant salivary gland tumor cells. **Lab Invest** 1999; 79: 583-9.

Queimado L, Lopes CS, Reis AM. WIF1, an inhibitor of the Wnt pathway, is rearranged in salivary gland tumors. **Genes Chromosomes Cancer**. 2007; 46: 215-25.

Queimado L, Obeso D, Hatfield MD, Yang Y, Thompson DM, Reis AM. Dysregulation of Wnt pathway components in human salivary gland tumors. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. 2008; 134: 94-101.

Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. **Circ Res**. 2010; 106: 1798-806.

Ries LAG, Hankey BF, Miller BA, Hartman AM, Edwards BK. Cancer Statistics Review, 1973- 88. National Cancer Institute: Bethesda, 1991.

Roth MJ, Hu N, Johnson LL, Quon-Hang W, Ahnen DJ, Iwamoto M, et al. beta-Catenin splice variants and downstream targets as markers for neoplastic progression of esophageal cancer. **Genes Chromosomes Cancer**. 2005; 44(4): 423-8.

Saldanha G, Ghura V, Potter L, Fletcher A. Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. **Br J Dermatol**. 2004; 151(1): 157-64.

Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F, Slattery ML. Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. **Cancer Res**. 1999; 59(7): 1442-4.

Saw D, Lau WH, Ho JH, Chan JK, Ng CS. Malignant lymphoepithelial lesion of the salivary gland. **Hum Pathol**. 1986; 17: 914-23.

Silva, R. **Envolvimento da Beta-catenina na via Wnt em meduloblastomas: estudo molecular e imunohistoquímico**. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina USP, 2008.

Schneider AB, Favus MJ, Stachura ME, Arnold MJ, Frohman LA. Salivary gland neoplasms as a late consequence of head and neck irradiation. **Ann Intern Med.** 1977; 87: 160-164.

Seifert, G. **Histological Typing of Salivary Gland Tumors. WHO International Histological Classification.** Berlin, Springer-Verlag, 1991.

Shieh YS, Chang LC, Chiu KC, Wu CW, Lee HS. Cadherin and catenin expression in mucoepidermoid carcinoma: correlation with histopathologic grade, clinical stage, and patient outcome. **J Oral Pathol Med.** 2003; 32: 297–304.

Shimura T, Takenaka Y, Fukumori T, Tsutsumi S, Okada K, Hogan V, et al. Implication of galectin-3 in Wnt signaling. **Cancer Res.** 2005; 65(9): 3535-7

Shiratsuchi H, Nakashima T, Hirakawa N, et al. Beta- Catenin nuclear accumulation in head and neck mucoepidermoid carcinoma: its role in cyclin D1 overexpression and tumor progression. **Head Neck.** 2007; 29: 577–84.

Slack GW, Gascoyne RD. MYC and aggressive B-cell lymphomas. **Adv Anat Pathol.** 2011; 18(3): 219-28.

Sugimura R, Li L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. **Birth Defects Res C Embryo Today.** 2010; 90(4): 243-56

Takahama Junior A, Almeida OP, Kowalski LP. Parotid neoplasms: analysis of 600 patients attended at a single institution. **Braz J Otorhinolaryngol.** 2009; 75(4): 497-501

Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, et al. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. **Oncogene.** 2002; 21(31): 4863-71.

Tchackray AC, Sabin LH. **World Health Organization internacional histological classification of tumours: histopathological typing of salivary gland tumours**, 2nd. Berlin: Springer-Verlag, 1972.

Thariat J, Vedrine PO, Orbach D, Marcy PY, Badoual C, Butori C, et al. [Salivary gland tumors in children]. **Bull Cancer.** 2011; 98(7): 847-55.

Toida M, Balazs M, Mori T, Ishimaru JI, Ichihara H, Fujitsuka H, et al. Analysis of genetic alterations in salivary gland tumors by comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet.** 2001; 127: 34-37.

Tsai CC, Chen CL, Hsu HC. Expression of Epstein-Barr virus in carcinomas of major salivary glands: a strong association with lymphoepithelioma-like carcinoma. **Hum Pathol.** 1996; 27: 258-262.

Tsukamoto AS, Grosschedl R, Guzman RC, Parslow T, Varmus HE. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. **Cell.** 1988; 55: 619-25.

Voeller HJ, Truica CI, Gelmann EP. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. **Cancer Res.** 1998; 58(12): 2520-3.

Yost C, Torres M, Miller JR, et al.: The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. **Genes Dev.** 1996; 10: 1443-54.

Zarbo RJ. Salivary gland neoplasia: a review for the practicing pathologist. **Mod Pathol.** 2002; 15(3): 298-323.

Zhou CX, Gao Y. Aberrant expression of beta-catenin, Pin1 and cylin D1 in salivary adenoid cystic carcinoma: relation to tumor proliferation and metastasis. **Oncol Rep.** 2006; 16: 505-11.

Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, Raffel C. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. **Cancer Res.** 1998; 58(5): 896-9.