

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA VIA  
DE SINALIZAÇÃO WNT/BETA-CATENINA EM AMOSTRA DE  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL E SUA  
RELAÇÃO COM FATORES DE PROGNÓSTICO**

**Marília Ferreira Andrade**

Uberlândia, 2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA VIA  
DE SINALIZAÇÃO WNT/BETA-CATENINA EM AMOSTRA DE  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL E SUA  
RELAÇÃO COM FATORES DE PROGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de  
Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas como requisito parcial para obtenção  
do Título de Doutor.

**Marília Ferreira Andrade**  
Orientador: Adriano Mota Loyola  
Co-orientador: Paulo Rogério de Faria

Uberlândia, 2016

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

---

A553a  
2016      Andrade, Marília Ferreira, 1983  
Avaliação da expressão gênica e proteica da via de sinalização Wnt/beta-catenina em amostra de carcinoma de células escamosas bucal e sua relação com fatores de prognóstico / Marília Ferreira Andrade. - 2016.  
91 f. : il.

Orientador: Adriano Mota Loyola.  
Coorientador: Paulo Rogério de Faria.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Boca - Tumores - Teses. 3. Imunohistoquímica - Teses. I. Loyola, Adriano Mota. II. Faria, Paulo Rogério de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Marilia Ferreira Andrade**

“ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/BETA-CATENINA EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CAVIDADE BUCAL E SUA RELAÇÃO COM FATORES DE PROGNÓSTICO”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 26 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Marco Túllio Brazão Silva  
UNIMONTES

Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues  
UNIUBE

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso  
FO/UFU

Profa. Dra. Roberta Rezende Rosa  
UNITRI

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola – orientador  
FO/UFU

## AGRADECIMENTOS

*À Universidade Federal de Uberlândia,*

instituição que proporcionou minha graduação e pós-graduação e o contato com professores brilhantes que inspiraram minha carreira acadêmica e mostraram o caminho da pesquisa científica e que através do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) e da Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas (PPIPA) possibilitaram a realização desse trabalho.

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),*

que proporcionou através do apoio financeiro as condições materiais necessárias para realização desse trabalho.

*Ao A.C. Camargo Cancer Center,*

que através do Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, diretor do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo, gentilmente possibilitou nosso acesso ao *core facility* para a construção do TMA e ao analista de pesquisa Carlos Ferreira Nascimento, que cedeu seu tempo para a confecção do TMA e com muito entusiasmo compartilhou seu conhecimento sobre a técnica, com dicas de montagem para que pudéssemos adaptá-la ao uso no laboratório de patologia bucal da UFU. Essa ajuda possibilitou o andamento muito mais rápido desse trabalho.

*Ao Prof. Dr. Adriano Mota Loyola,*

Pela confiança depositada em mim durante todos esses anos de orientação, desde o mestrado até hoje, o que se somam oito anos de convívio. Foi o senhor quem me ensinou a fazer pesquisa e que depositou esperanças em mim desde o princípio. Sei que não correspondo às suas expectativas científicas sobre mim, mas saiba que além da admiração profissional que tenho pelo senhor também uma relação de amizade e carinho foi construída, e por isso, sou grata. Obrigada por me guiar todos esses anos. Certamente minha apreciação pela pesquisa científica aumentou depois de conviver com alguém tão apaixonado pelo que faz.

*Ao Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria,*

Por todo conhecimento compartilhado, por todo apoio durante as dificuldades encontradas na realização deste trabalho, especialmente na coleta da amostra. Agradeço imensamente pela

sua co-orientação que certamente contribuiu para meu desenvolvimento científico, e foi de imensa ajuda nos experimentos.

*Ao Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva,*

que ajudou-me em toda a parte de PCR em tempo real, agradeço muito pela disposição em ensinar todos os passos detalhados do experimento, pela liberdade fornecida em seu laboratório e por todo conhecimento compartilhado. Obrigada pelo apoio e confiança, que mesmo por pouco tempo foi fundamental para que eu pudesse amadurecer minha prática laboratorial e reforçar ainda mais meu gosto pela pesquisa.

*Ao Laboratório de Patologia Bucal e de Reprodução,*

e todos seus integrantes, incluindo as técnicas Ângela e Lúbia, que sempre mostraram-se muito prestativas em todos os serviços solicitados.

Ao João Paulo Servatto, companheiro e amigo de doutorado, que sempre esteve disposto em ajudar, esclarecer e ensinar, dividindo comigo as angústias, alegrias e sofrimentos principalmente na reta final de nossos trabalhos.

À Flávia Sayuri Matsuo, companheira de trabalho, que me ajudou imensamente em todas as etapas laboratoriais e que o convívio diário proporcionou o surgimento de uma amizade e admiração.

À Gabriela, Roberta, Silas, Luiz Fernando, Leana, Kamilla, Daniela, Douglas, e muitos outros alunos do laboratório pela ajuda fornecida ou mesmo pela companhia, amenizando o cansaço dos experimentos diários.

Aos integrantes do laboratório de Reprodução Talita, Nádia, Felipe, Daniele, Bruna, Bruninha, Mari, Sara e Laisa por me integrar tão bem ao laboratório, pela companhia e pelos ensinamentos compartilhados.

*Outros laboratórios,*

aos laboratórios de imunologia, genética e histologia que contribuíram com a estrutura necessária para que o trabalho pudesse ser realizado.

*À minha família,*

Sem vocês eu não chegaria até aqui. Em especial, ao meu esposo Flávio, pelo apoio, amor, paciência e investimento. Aos meus filhos, Laura e Henrique (que inclusive foi gerado,

gestado e nasceu durante o período do trabalho), pelo amor, pelos abraços, beijos e sorrisos, e pela compreensão da minha ausência. Eterna gratidão!

À minha mãe, pessoa que além de ensinar-me tudo na vida e apoiar-me sem restrições, me apresentou, inspirou e inspira a seguir na vida acadêmica. Obrigada por estar sempre comigo, por ajudar com as crianças, por cuidar também de mim.

Aos meus sogros, Manolo e Silvana, por todo apoio nos cuidados com as crianças durante minha ausência em casa.

*Dedico este trabalho à minha família, em especial meu esposo Flávio, filhos Laura e Henrique e minha mãe Eliane. Sem o apoio de vocês não seria possível realizar este feito. Todo meu esforço em busca de um maior conhecimento e conseqüente titulação profissional faz parte do meu objetivo maior, que é o de proporcionar a vocês o melhor de mim.*

## RESUMO

O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) no Brasil está situado entre as 10 mais frequentes neoplasias e entre as 20 maiores causas de morte na população. Na maioria dos casos o diagnóstico é realizado em estágio avançado e, portanto o paciente apresenta-se com um prognóstico ruim. Assim, estudos que investigam as proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular têm sido realizados com o objetivo de se estabelecer futuros biomarcadores de diagnóstico e prognóstico. A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina compõe a regulação de uma grande variedade de processos fisiológicos em diferentes espécies, com um papel decisivo no desenvolvimento embrionário, proliferação e diferenciação celular. Sua participação aparece como candidata natural a ser investigada na carcinogênese e na progressão do CCEB bucal. Dentre os vários genes relacionados a essa via, está o *CTNNB1* sendo a  $\beta$ -catenina o produto gênico da sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina mais importante. O objetivo do estudo foi identificar o padrão de transcrição dos genes (expressão funcional) *GSK3 $\beta$* , *APC*, *CCTBN*, *c-MYC*, *CCND1* e *CDH1* pertencentes à via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e sua relação com as respectivas proteínas (GSK3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC,  $\beta$ -catenina, c-myc, ciclina D1 e E-caderina) em uma amostra de conveniência tecidual de CCEB, bem como sua relação com fatores clínico-patológicos considerados possíveis marcadores de sua progressão e metástase. Os casos de CCEB empregados no estudo foram confirmados histologicamente e divididos em dois grupos: primários não metastáticos (PNM) e metastáticos (PM). A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real. Para estudo imuno-histoquímico, utilizou-se a técnica de TMA (*Tissue Microarray*) e o método estreptavidina-biotina-peroxidase para a revelação das proteínas. A maioria dos pacientes eram homens, com média de idade a igual a 60 anos, tabagistas e etilistas, diagnosticados em estágio avançado, com lesões menores que 4 cm, sendo a língua a topografia mais afetada. Houve maior expressão funcional dos genes investigados no grupo CCEB comparado ao controle, com  $p < 0,05$  para *CCND1* e *CDH1*. Na comparação entre controle, PNM e PM a expressão funcional de *CTNNB1* foi menor no grupo PM comparado ao controle ( $p < 0,05$ ). A expressão proteica também mostrou-se maior no grupo CCEB comparada ao controle, sendo esse aumento estatisticamente significativo no grupo PM para APC, c-Myc e E-caderina. Não foram encontradas associações entre as expressões proteicas e fatores clinicopatológicos que indiquem progressão de doença, tais como, presença de metástase e estágio avançado. Houve uma correlação positiva entre c-Myc e  $\beta$ -catenina ( $p < 0,0001$ ). Nossos resultados apontam que a via Wnt/ $\beta$ -catenina parece não estar ativada ou funcionando de forma expressiva nos CCEB e na progressão tumoral.

**Palavras chave:** Carcinoma de Células Escamosas Bucal. Real Time PCR. Imuno-histoquímica. Via de Sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina.

## ABSTRACT

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is one of the 10 most prevalent lesions and the 20th cause of deaths in Brazil. In most cases the diagnosis is detected in an advanced stage, hence the patient has a poor prognosis. Thus, studies with proteins that are involved in signaling pathways have been widely investigated as possible new therapeutic targets to aid the early diagnosis and prognosis. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway comprises the regulation of a wide variety of physiological processes in different species, with a decisive role in embryonic development, cell proliferation and differentiation. Alterations in components of this pathway have also been reported in neoplasms of the oral cavity and it appears as a natural candidate to be investigated in oral carcinogenesis and tumor progression of the OSCC. Among the various related genes investigated in Wnt/ $\beta$ -catenin pathway there is the *CTNNB1* being  $\beta$ -catenin the most important protein. The aim of this study was to identify the *GSK3 $\beta$* , *APC*, *CCTBN*, *c-MYC*, *CCND1* e *CDH1* gene expression and its relation to their respective proteins (GSK3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC,  $\beta$ -catenin, c-myc, cyclin D1 e E-caderin) in a convenience cohort of OSCC. Associations between clinical and pathological aspects considered possible progression and metastasis markers were verified. All OSCC diagnoses were histologically confirmed and categorized in two groups: non-metastasizing (PNM) and metastasizing primary tumors (PM). For gene expression, it was used the real time PCR approach. For immunohistochemistry proposal, it was performed a TMA technique and all proteins was revealed by the streptavidin-biotin peroxidase method. Most patients were male, average age of 60, smokers and drinkers, diagnosed in advanced stage of disease, with lesions measuring less than 4cm and the tongue being the most affected location. The relative expression of all investigated genes was higher in the control group, with  $p < 0,05$  for *CCND1* and *CDH1*. The *CTNNB1* relative expression decreased in the comparison among the control, PNM and PM groups, being statistically significant between control and PM groups. The immunohistochemical results showed increased expression in OSCC in relation to control, being statistically significant for APC, c-Myc and E-caderin in the PM group. There were not found any associations between expression of GSK3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC,  $\beta$ -catenin, c-myc, cyclin D1 e E-caderin and clinical and pathological aspects considered possible progression and metastasis markers. The correlation analysis showed significant positive correlation between c-Myc and  $\beta$ -catenin ( $p < 0,0001$ ). In conclusion, these results indicate that the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway seems to be inactivated or not been expressed in OSCC and tumor progression.

**Keywords:** Oral Squamous Cell Carcinoma. Real Time PCR. Immunohistochemistry. Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway.

## LISTA DE ABREVIACOES

CCEB	Carcinoma de Células Escamosas Bucal
WNT	Unio dos nomes dos genes wingless e int-1, formando a sigla que designa grupo de moléculas de via de sinalizao
CTNNB	beta-catenin
CCND1	Cyclin D1
CDH1	E-cadherin
GSK3B	Glicogen Sinthase Kinase 3 beta
APC	Adenomatous polyposis coli
MYC	oncogene homólogo do gene <i>v-myc</i> da mielocitomatose aviária
CK1	Casein Kinase 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ser	Serina
Snail	<i>Snail family zinc finger</i>
TCF/LEF	<i>T-cell receptor/lymphoid enhancer factor</i>
TMA	<i>Tissue Micro array</i>
Tyr	Tirosina
LOH	Loss of heterozygosis
HPV	Human Papilloma Virus
LRP	LDL-receptor related protein
FZ	Frizzled
Gal-3	Galectina 3
MMP	matrix metalloproteinases
Dsh	Dishevelled
DKK	Dickkopf
B- TrCP	Beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase
JUNv-Jun	Sarcoma vírus 17 oncogene homolog
IgG	Imunoglobulina
EpCAM	Epithelial cellular adhesion molecule
ESRP	Epithelial Splicing Regulatory Protein

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Fotografias de pacientes com CCEB em estágio avançado	20
FIGURA 2	Cortes histológicos corados em H&E	21
FIGURA 3	Desenho esquemático da via canônica de sinalização WNT	25
FIGURA 4	Princípio básico para técnica de construção de matrizes teciduais (TMA)	41
FIGURA 5	Mapa do TMA confeccionado, indicando a posição de cada caso na lâmina	42
FIGURA 6	Expressão relativa dos genes <i>GSK3<math>\beta</math></i> , <i>APC</i> , <i>CCTBN</i> , <i>c-Myc</i> , <i>CCND1</i> e <i>CDH1</i> nos grupos controle e CCEB	48
FIGURA 7	Expressão relativa dos genes <i>GSK3<math>\beta</math></i> , <i>APC</i> , <i>CCTBN</i> , <i>c-Myc</i> , <i>CCND1</i> e <i>CDH1</i> nos grupos controle e PNM e PM	49
FIGURA 8	Curvas de Kaplan-Meier para tempo de sobrevida global dos 90 pacientes com CCEB	52
FIGURA 9a	Imagens das reações imunohistoquímicas para as proteínas GSK3 $\beta$ (A: grupo controle; B: grupo PNM; C: grupo PM), pGSK3 $\beta$ -Ser9 (D: grupo controle; E: grupo PNM; F: grupo PM), $\beta$ -catenina (G: grupo controle; H: grupo PNM; I: grupo PM), APC (J: grupo controle; K: grupo PNM; L: grupo PM), c-Myc (M: grupo controle; N: grupo PNM; O: grupo PM) [Continua na Figura 9b).	56
FIGURA 9b	[Continuação da Figura 9a] Imagens das reações imunohistoquímicas para as proteínas ciclina D1 (P: grupo controle; Q: grupo PNM; R: grupo PM) e E-caderina (S: grupo controle; T: grupo PNM; U: grupo PM) nos grupos controle, PNM e PM respectivamente	57
FIGURA 10	Expressão imuno-histoquímica de cada proteína em relação aos grupos controles e o grupo CCEB	58
FIGURA 11	Expressão imuno-histoquímica das proteínas nos grupos controle, PNM e PM	59
FIGURA 12	Análise de correlação entre as proteínas estudadas que foram estatisticamente significativas ( $r$ - coeficiente de variação)	63

## **LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1	Descrição dos parâmetros para o estadiamento clínico adotado no estudo	37
QUADRO 2	Sequência dos primers forward e reverse com suas respectivas referências	38
QUADRO 3	Anticorpos utilizados nos ensaios imunohistoquímicos	43

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Distribuição dos scores conforme a porcentagem e intensidade de células marcadas	45
TABELA 2	Distribuição dos 17 pacientes com CCEB cujas amostras foram utilizadas em ensaio de <i>qPCR</i> , quanto aos dados sociodemográficos e clinicopatológicos	47–8
TABELA 3	Distribuição dos 90 pacientes com CCEB cujas amostras foram utilizadas em ensaio imunohistoquímico, quanto aos dados sociodemográficos e clinicopatológicos	51
TABELA 4	Descrição dos valores de mediana de índices <i>Quickscore</i> de cada uma das proteínas estudadas encontrados na análise semiquantitativa dos ensaios imuno-histoquímicos nos grupos controle, carcinomas de células escamosas, primários metastáticos e não metastáticos	55
TABELA 5	Expressão das proteínas da via Wnt- $\beta$ -catenina, GSK3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC, $\beta$ -catenina, c-Myc, ciclina D1 e E-caderina e sua relação com as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas dos 90 pacientes com CCEB	60
TABELA 6	Análise da expressão proteica de acordo o compartimento celular de expressão de cada uma das proteínas estudadas segundo o grau de diferenciação dos 90 casos de CCEB	62–3

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	18
2.1	<b>O Carcinoma de Células Escamosas Bucal (CCEB)</b>	18
2.2	<b>Via de Sinalização Wnt/ <math>\beta</math>-catenina</b>	22
2.3	<b>Caracterização dos principais componentes da via Wnt e seu papel no câncer</b>	26
2.3.1	<i>GSK 3<math>\beta</math></i>	26
2.3.2	<i>APC</i>	28
2.3.3	<i><math>\beta</math>-Catenina</i>	29
2.4	<b>A Via WNT e o Carcinoma de células escamosas bucal</b>	31
3	<b>JUSTIFICATIVA E PROPOSIÇÃO</b>	34
4	<b>OBJETIVOS</b>	35
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	36
5.1	<b>Casuística</b>	36
5.2	<b>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time PCR, qPCR)</b>	37
5.2.1	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)	37
5.2.2	<i>Extração de RNA</i>	38
5.2.3	<i>Transcrição reversa</i>	39
5.2.4	<i>qPCR</i>	39
5.3	<b>Arranjo em matriz de amostras teciduais (Tissue Microarray- TMA)</b>	40
5.4	<b>Ensaio imunohistoquímico</b>	43
5.5	<b>Avaliação da Imuno-histoquímica</b>	44
5.6	<i>Estatística</i>	45
6	<b>RESULTADOS</b>	47
6.1	<b>Análise da Expressão Gênica</b>	47
6.1.1	<i>Descrição sócio-demográfica e clinicopatológica da amostra de CCEB utilizada para ensaio qPCR</i>	47
6.1.2	<i>Expressão gênica relativa entre os grupos CCEB e controle</i>	48
6.1.3	<i>Expressão Gênica Relativa entre os grupos PNM, PM e controle</i>	49
6.2	<b>Análise da expressão protéica</b>	49
6.2.1	<i>Descrição sócio-demográfica e clinicopatológica da amostra de CCEB utilizada para ensaio imunohistoquímico</i>	49
6.2.2	<i>Descrição do padrão de marcação para cada anticorpo estudado e análise de Quickscore</i>	53
6.2.3	<i>Expressão das proteínas da via Wnt-<math>\beta</math>-catenina</i>	57

6.2.4	<i>Expressão das proteínas em relação às variáveis clinicopatológicas</i>	59
6.2.5	<i>Análise da expressão proteica por compartimento celular em relação ao grau de diferenciação do tumor</i>	61
6.2.6.	<i>Correlação geral entre as proteínas estudadas</i>	62
7	<b>DISCUSSÃO</b>	64
8	<b>CONCLUSÃO</b>	73
9	<b>REFERÊNCIAS</b>	74

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer bucal constitui-se um importante problema que aflige não somente o Brasil, mas outros países de diferentes continentes. Especificamente no Brasil, o câncer bucal está situado entre as 10 mais frequentes neoplasias que acometem homens e mulheres, e entre as 20 maiores causas de morte na população (DANTAS *et al.*, 2016). Soma-se a isso, o fato de estar entre os cinco tipos de câncer de pior prognóstico, pois a maioria é diagnosticada nos estágios III e IV, tal que a taxa de sobrevivência se torna baixa e o custo de tratamento extremamente alto (BAGAN *et al.*, 2010; DANTAS *et al.*, 2016). É nesse contexto que esforços têm sido desenvolvidos para descobrir os mecanismos que expliquem o seu início e progressão.

Nesse sentido, a participação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina já identificada em outros tipos de câncer, aparece como candidata natural a ser investigada na carcinogênese bucal. Dentre os vários genes relacionados a essa via pode-se citar os genes *APC*, *CTNNB1* (gene da  $\beta$ -catenina), *AXINA* e *GSK-3 $\beta$* , sendo a  $\beta$ -catenina o produto gênico mais importante dessa via de sinalização (DAA *et al.*, 2004). Esses genes normalmente apresentam importantes papéis no desenvolvimento embrionário e na vida pós-natal e estão intimamente relacionados com controle dos mecanismos que regem a proliferação celular (LO MUZIO, 2001). Outros estudos têm também mostrado que as alterações moleculares vinculadas à transformação neoplásica estão relacionadas com alterações no processo de degradação da  $\beta$ -catenina no citoplasma e que, no geral, são diretamente ligadas a mutações que afetam as proteínas APC, AXINA e a própria  $\beta$ -catenina (IWAI *et al.*, 2005; MORIN *et al.*, 1997). Por exemplo, em amostras de carcinoma de células escamosas bucal (CCEB), a perda de heterozigidade (LOH) do gene *APC* foi observada entre 25% a 75% dos tumores. Esta afetava preferencialmente o exon 15, podendo explicar o acúmulo citoplasmático de  $\beta$ -catenina e a ativação transcricional de genes alvos da via de sinalização Wnt, como *CCND1* (gene da ciclina D1) e *MYC* (gene da c-Myc) (HUANG *et al.*, 1997).

Outro membro importante dessa via de sinalização, o gene *GSK3- $\beta$* , participa na regulação da homeostasia dos tecidos epiteliais, mostrou-se relacionado com transformação maligna de diferentes tipos teciduais (MISHRA, 2010). Em carcinomas gástricos, por exemplo, a alta expressão de *GSK3- $\beta$*  tem sido correlacionada com progressão tumoral, em especial invasão vascular, metástase locorregional e ao estadiamento tumoral (ZHENG *et al.*,

2010). Em carcinomas de cólon a expressão de *GSK3-β* é maior quando comparada com tumores benignos (WANG *et al.*, 2009).

Em relação à  $\beta$ -catenina, a principal efetora da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, um grande corpo de evidência indica que sua expressão anormal está associada com transformação e progressão tumoral, embora os mecanismos ainda sejam desconhecidos (CHAU *et al.*, 2001; DAA *et al.*, 2004; KUDO *et al.*, 2004). Em hepatocarcinomas, alterações na expressão nuclear de  $\beta$ -catenina estão associadas com mutação em seu gene (WONG *et al.*, 2001). Em condições fisiológicas, a mucosa bucal exibe marcação em membrana para  $\beta$ -catenina. Em contraste, o acúmulo citoplasmático de  $\beta$ -catenina é frequentemente observado em tecidos e linhagens celulares de CCEB (LO MUZIO *et al.*, 1999; GAO *et al.*, 2005), não estando relacionado com alterações de mutação gênica (IWAI *et al.*, 2005). Em um estudo com amostras de CCEB, Não foi observada a expressão de  $\beta$ -catenina no compartimento nuclear, o que sugere que apenas uma pequena porção livre da proteína seja de fato transferida para esse compartimento onde genes alvos são ativados e transcritos, não havendo relação com mutações no gene *CTNNB1* (IWAI *et al.*, 2005). Foi mostrado ainda que a presença de  $\beta$ -catenina não estava associada com mutações nos genes *APC*, *AXINA* e como já mencionado, no gene *CNNTB1*, como tem sido observado em outros tumores, indicando que a localização sub-celular da  $\beta$ -catenina pode ser tumor-dependente.

Como pode ser notada, a ativação aberrante da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina pode contribuir com desenvolvimento e progressão tumoral de CCEB. Além disso, não há ainda nenhum estudo que avalie a expressão de todas as proteínas pertencentes a essa via nesses tumores, relacionando-as com fatores clinicopatológicos de interesse prognóstico. Assim, nos propusemos a estudar, em uma amostra conveniente de CCEB obtida dos arquivos dos Laboratórios de Anatomia Patológica e de Patologia Bucal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), o padrão de expressão gênica de *GSK-3β*, *APC*, *CTNNB1*, *MYC*, *CCND1* e *CDH1* bem como de seus produtos proteicos GSK3β, pGSK3β-Ser9, APC,  $\beta$ -catenina, c-Myc, ciclina D1 e E-caderina, procurando a associação destes resultados com fatores de clinicopatológicos de interesse prognóstico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Carcinoma de Células Escamosas Bucal (CCEB)

O câncer bucal, que segundo classificação preconizada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA-Brasil) inclui os cânceres de lábio e de diferentes topografias da boca propriamente dita, compreende cerca de 30% dos cânceres humanos (GENDEN; FERLITO; SILVER, 2010). Mundialmente, esse tumor ocupa a décima primeira posição para o sexo masculino e a décima sétima para o sexo feminino, correspondendo 2,7% e 1,5% dos cânceres, respectivamente (FERLAY *et al.*, 2012). Segundo estimativas do INCA (Brasil), o câncer de boca é a sexta neoplasia maligna mais frequente no Brasil, sendo responsável por cerca de 15.490 novos casos/ano, sendo 11.140 em homens e 4.350 em mulheres (INCA, 2016). O risco de desenvolver a doença é maior com o aumento do período de exposição aos fatores de risco e conseqüente aumento da idade. Assim, o câncer bucal tem uma predileção pelos pacientes do sexo masculino com a média etária situando-se entre 6ª e 7ª décadas de vida (FELLER; LEMMER, 2012; WARNAKULASURIYA, 2009). No entanto, a incidência em mulheres vem aumentando nas últimas décadas (JOHNSON *et al.*, 2005; WARNAKULASURIYA, 2009).

O CCEB é uma neoplasia do epitélio de revestimento que representa mais de 90% das lesões malignas da região da cabeça e pescoço (WARNAKULASURIYA, 2009; GENDEN; FERLITO; SILVER, 2010; MEHROTRA; YADAV, 2006). É considerado um grave problema de saúde pública mundial com estatísticas que apontam altos índices de incidência e mortalidade, apresentando variações epidemiológicas de um país para outro ou mesmo dentro de cada país (BRENER *et al.*, 2007, HARRIS *et al.*, 2015). Definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma neoplasia epitelial invasiva com graus de diferenciação variando de bem a pobremente diferenciado e alta propensão para o desenvolvimento de metástases locorregionais, o CCEB tem como principais fatores de risco o tabaco e o álcool (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011). Além desses fatores, a pobre higienização bucal e a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) também estão relacionados, de forma ainda duvidosa, ao seu desenvolvimento (MISHRA, 2010).

O CCEB acomete geralmente homens a partir da sexta década de vida (LAM *et al.*, 2007), mas observou-se um aumento da incidência em adultos jovens e mulheres em função do aumento do consumo de tabaco e álcool (DURAZZO *et al.*, 2005, WARNAKULASURIYA *et al.*, 2007; GRANATO *et al.*, 2014).

O CCEB pode ocorrer em qualquer região da boca. Sua incidência está relacionada ao fator de risco associado, como é o caso da lesão de lábio, a qual tem como principal agente causal a exposição crônica a radiação ultravioleta (JOHNSON *et al.*, 2005). Para outras regiões, os produtos do tabaco associados ao álcool estão entre os principais fatores causais. De um modo geral, os sítios mais frequentemente acometidos são assoalho bucal, borda lateral de língua e palato (JOHNSON *et al.*, 2005; SARASWATHY *et al.*, 2014).

Nos últimos 30 anos, apesar do desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o CCEB mais eficientes, as taxas de sobrevivência dos pacientes acometidos ainda persistem baixas para cinco anos de seguimento (MALI, 2014; DANTAS *et al.*, 2016). Quando o diagnóstico do CCEB é feito na fase inicial, as taxas de sobrevivência ficam em torno de 80%, enquanto para lesões avançadas podem chegar próximos a 20%, ficando na média de 50%. Isso se deve a fatores como diagnóstico tardio associado a lesões de grandes dimensões e já com metástases (DANTAS *et al.*, 2016).

A experiência em diferentes centros de diagnóstico e tratamento do CCEB mostra que sua detecção é usualmente realizada em estágios avançados. Isto se deve, em parte, a ausência de sintomatologia nos estágios iniciais, e a padrões heterogêneos de progressão. Outro possível fator é a heterogeneidade molecular interlesional que poderia explicar o comportamento variável desse tumor entre os pacientes, em situações de estadiamento clínico similar (BAGAN *et al.*, 2010; LEEMANS *et al.*, 2011). Ademais, discute-se também o efeito da dificuldade de percepção da lesão como câncer pelo paciente que interferindo no diagnóstico precoce, repercute diretamente no prognóstico do câncer (DANTAS *et al.*, 2016).

Este ambiente salienta ainda mais a importância do autoexame, especialmente em pacientes que fazem uso do tabaco e álcool, e uma atuação mais assertiva do profissional na busca ativa das lesões durante o atendimento dos pacientes na sua rotina de atendimento.

As características clínicas do CCEB variam de acordo com o estágio da doença. Nos estágios iniciais, o CCEB pode apresentar-se como uma lesão ulcerativa, eritroplásica, leucoplásica ou eritroleucoplásica, firme à palpação e geralmente indolor (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; JOHNSON *et al.*, 2005). Nos estágios avançados, por outro lado, a lesão é ulcerada e infiltrativa, com margens irregulares e de bordos elevados e endurecidos (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; JOHNSON *et al.*, 2005), conforme Figura 1, a seguir.

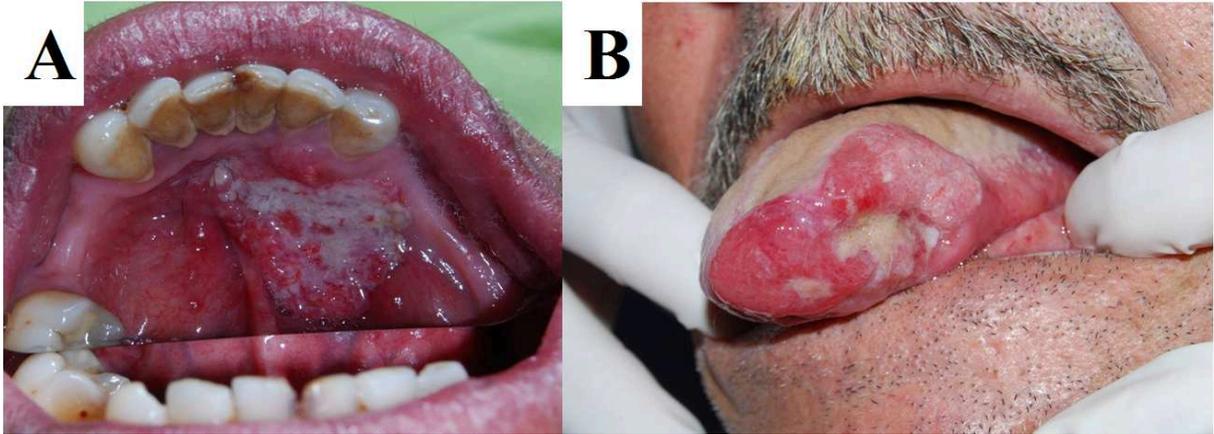


FIGURA 1 – Fotografias de pacientes com CCEB em estágio avançado. Em (A) nota-se lesão ulcerativa em assoalho bucal. Em (B) pode-se notar outra lesão ulcerada em região lateral de língua de bordos elevados e endurecidos.

Fonte: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA/UFU, s. d. — fotógrafo não identificado.

Para esses pacientes, a sintomatologia está presente e pode variar de acordo com a localização, sendo os mais frequentes disfagia, odinofagia, dispneia e perda de peso (JOHNSON *et al.*, 2005). Embora esses aspectos clínicos sejam os classicamente descritos na literatura, cabe mencionar que alguns pacientes podem desenvolver cânceres a partir de lesões potencialmente malignas, como leucoplasias, eritropiasias e, principalmente, as eritroleucoplasias, sendo que estas frequentemente demonstram displasia grave e/ou carcinoma no momento do diagnóstico (PITIYAGE *et al.*, 2009).

A transformação do epitélio normal em CCEB envolve passos importantes, como a ativação sequencial de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor, além de vários outros eventos genéticos e epigenéticos, que promoverão desequilíbrios em vias moleculares regulatórias fundamentais (LEEMANS *et al.*, 2011). Nesse processo, os vários elementos não tumorais e tumorais se interagem profundamente, resultando em modificações fenotípicas na célula epitelial, culminando com alterações relacionadas à adesão celular, remodelação de citoesqueleto e modificações entre célula-matriz extracelular (proteólise de matriz extracelular e de membrana basal) (HOWELL; GRANDIS, 2005). Assim, essas alterações, quando somadas, levam a desregulação das funções básicas da célula, progredindo pelos eventos de displasia, carcinoma in situ, invasão e metástase (WILTING *et al.*, 2002, ROEPMAN *et al.*, 2005). Presentes ainda no processo de carcinogênese, a angiogênese e a linfangiogênese ocorrem, em virtude da necessidade de um aporte nutricional às células neoplásicas proliferantes, eventos que também são implicados no desenvolvimento de metástases (FRANCHI *et al.*, 2004; DADRAS *et al.*, 2005; GOMBOS *et al.*, 2005).

Com relação ao aspecto histológico, o CCEB é classificado de acordo com o grau de diferenciação de suas células (FIG. 2). Nos casos classificados como bem diferenciados as células neoplásicas se assemelham muito ao tecido epitelial de origem, mas com presença de certo grau de pleomorfismo nuclear (anisocariose) e citoplasmático (anisocitose), nucléolos evidentes e algumas figuras de mitoses. A queratinização abundante é um dos aspectos clássicos nos tumores com esse fenótipo. Naqueles tumores classificados como moderadamente diferenciados, observa-se um maior grau de anisocariose e anisocitose nas células neoplásicas, exibindo nucléolos grandes e múltiplos, maior taxa de mitoses típicas e atípicas e menor grau de queratinização. Por fim, os tumores classificados como pobremente diferenciados são compostos por células anaplásicas, mostrando numerosas figuras de mitoses típicas e atípicas, e queratinização mínima ou ausente (JOHNSON *et al.*, 2005).

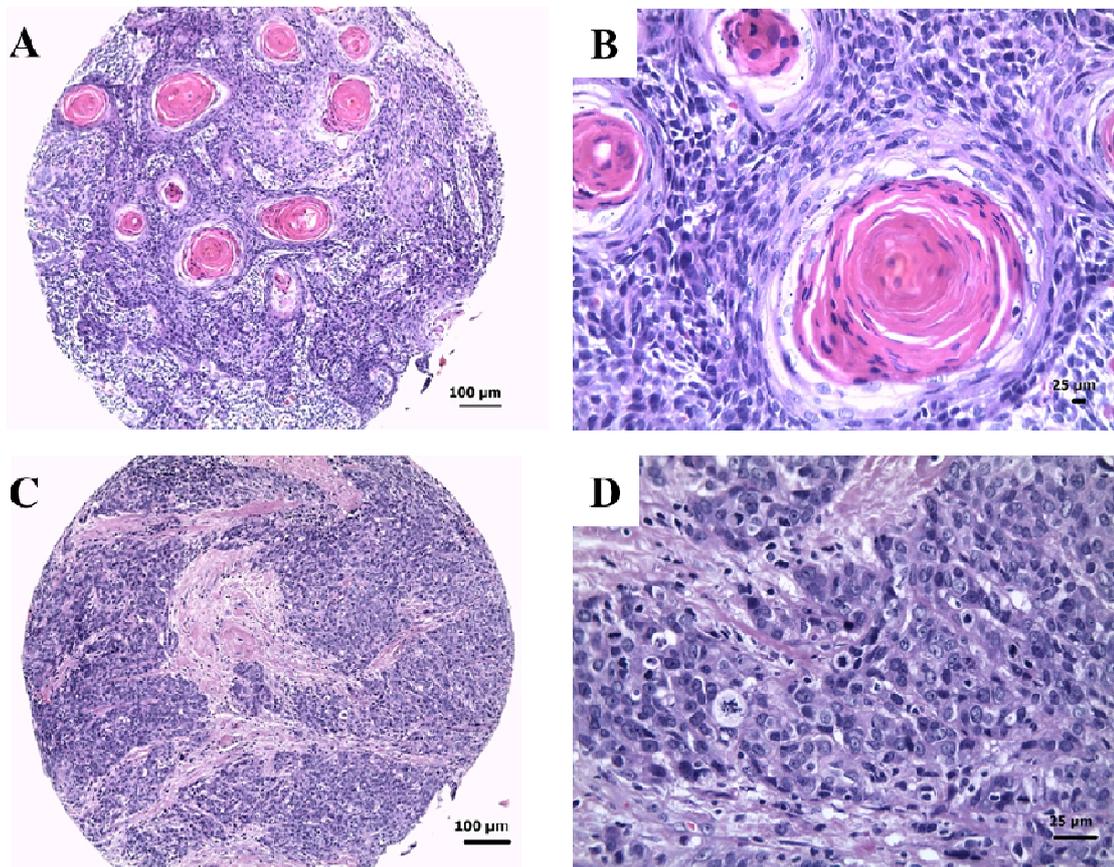


FIGURA 2 – Cortes histológicos corados em H&E. Em A, imagens do CCEB bem diferenciado, amplificada em B, em que se nota grande densidade de pérolas córneas. Em C, observa-se seção histológica de outro caso de CCEB classificado como pobremente diferenciado, ampliado em D, no qual é possível notar acentuado grau de anaplasia. Percebe-se grande densidade celular associada a anisocariose, hiperchromatismo nuclear, maior densidade mitótica, com mitoses atípicas (Hematoxilina e Eosina, aumento original em A e C: 100X, e em B e D: 400X).

Fonte: UFU, s. d. — fotógrafo Marília Ferreira Andrade .

O estabelecimento do planejamento terapêutico do CCEB baseia-se principalmente em parâmetros clínicos, radiológicos e histopatológicos. O prognóstico é determinado pelo estadiamento clínico do tumor: TNM (T: tamanho do tumor; N: presença e extensão de metástase linfonodal; M: presença ou ausência de metástase à distância) desenvolvido pela *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) e da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (NI *et al.*, 2015). Estima-se que lesões metastáticas são clinicamente evidentes em aproximadamente 40% dos pacientes, enquanto que metástases ocultas podem variar de 15% a 34 (LIAO *et al.*, 2007; BAGAN *et al.*, 2010).

De maneira geral, o tratamento do CCEB é feito primariamente por cirurgia podendo ser acompanhado de radio e quimioterapia. Nas lesões iniciais, a cirurgia ou radioterapia são os tratamentos de escolha e tem como foco a busca pela cura. Já nos casos avançados, a combinação de quimioterapia (terapia sistêmica) e radioterapia e/ou cirurgia (terapia local) são frequentemente utilizados (FELLER; LEMMER, 2012).

No que diz respeito ao prognóstico, a presença de metástases locorregionais é um dos fatores mais importantes para a determinação do prognóstico do paciente, influenciando diretamente sua sobrevivência (LEEMANS *et al.*, 1994; CORTESINA; MARTONE, 2006). A metástase pode ser interpretada como processo dinâmico em que clones de células adquirem a capacidade de invadir e disseminar para outros órgãos (KLEIN, 2009; NOGUTI *et al.*, 2012). Muitas moléculas estão envolvidas nesse processo e a compreensão cada vez maior dos mecanismos moleculares envolvidos tem permitido o estudo de biomarcadores preditivos de metástase. No entanto, ainda não existe na literatura um consenso a cerca dos mecanismos moleculares envolvidos (CORTESINA; MARTONE, 2006; OLIVEIRA; SILVA, 2010).

A heterogeneidade genética, fenotípica e de comportamento biológico do CCEB tem dificultado as estratégias comuns e eficazes para seu diagnóstico e tratamento (KANOJIA; VAIDYA, 2006; HARRIS *et al.*, 2015). Com o propósito de realizar estimativas mais precisas acerca do comportamento biológico destes tumores, vários estudos têm sido direcionados na investigação marcadores moleculares capazes de prever o comportamento do CCEB, incluindo genes e seus produtos proteicos (LIAO *et al.*, 2007; LEA *et al.*, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011; POLACHINI *et al.*, 2012).

## 2.2 Via de Sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina

A via de sinalização Wnt- $\beta$ -catenina é crucial para o desenvolvimento embriológico de uma variedade de organismos que vão desde os *C.elegans* aos mamíferos, estando envolvida na

regulação de uma grande variedade de processos fisiológicos (KLAUS; BIRCHMEIER, 2008). As proteínas da família Wnt constituem um grupo de glicoproteínas secretadas, ricas em aminoácido cisteína, com aproximadamente 350-400 aminoácidos. Nos seres humanos, existem 19 membros conhecidos dessa família, os quais desempenham papéis essenciais na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (GILES *et al.*, 2003; MacDONALD *et al.*, 2009).

As proteínas Wnt atuam de modo parácrino (comunicação célula-célula) por meio da ativação de diversas cascatas de sinalização dentro de suas células alvo. A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (via canônica ou clássica) tem recebido considerável atenção dos pesquisadores em oncologia nos últimos anos por ter vários de seus componentes desenvolvendo importante papel na formação tumoral (LUSTIG; BEHRENS, 2003)

A sinalização Wnt se faz por três vias principais:

- 1) **A via Wnt clássica ou canônica (via Wnt/ $\beta$ -catenina):** ativa genes alvo através da estabilização de  $\beta$ -catenina no núcleo, sendo a via mais estudada na tumorigênese; e as vias não canônicas:
- 2) **A via Wnt da polaridade celular:** regula a polaridade celular através da mediação da organização do citoesqueleto;
- 3) **A via WNT dependente de  $Ca^{2+}$ :** envolve o aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular e a ativação de componentes de sinalização da via dependentes de  $Ca^{2+}$  (pode interferir na via canônica Wnt; porém, não está claro se esta via está conservada nos mamíferos e qual sua participação na tumorigênese).

A cascata de sinalização da via Wnt/ $\beta$ -catenina controla o comportamento celular direcionando as propriedades de transcrição das proteínas ligantes de DNA da família *T-cell receptor/limphoyd enhancer fator 1* (TCF/LEF-1). Na ausência da sinalização Wnt, as proteínas ligantes de DNA da família TCF/LEF-1 se associam a correceptores bloqueando a expressão dos genes alvo da via. No centro da via Wnt/ $\beta$ -catenina está a estabilização da  $\beta$ -catenina citoplasmática, que livre, transloca-se para o núcleo e participa na ativação dos genes alvo através da ligação com TCF/LEF-1 (LUSTIG; BEHRENS, 2003). Na ausência de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, o *pool* citosólico de  $\beta$ -catenina é continuamente degradado, como resultado da sua fosforilação pela proteína GSK3 $\beta$  e subsequente degradação através da via ubiquitina-proteossomo (DAKENG *et al.*, 2012).

Das 19 proteínas Wnt humanas conhecidas, as mais estudadas e que reconhecidamente iniciam a sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina são Wnt-1, Wnt-3a e Wnt-18. Sabe-se que a região amino-terminal das proteínas Wnt fazem a interação com os receptores de Wnt e que a porção carboxi-terminal dessas proteínas é responsável pela ativação desses mesmos receptores. (MILLER, 2002; LUSTIG; BEHRENS, 2003).

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

Quando a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é ativada (FIG. 3), o complexo de destruição multiproteico formado por AXINA ou sua homóloga Conductina, *glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK-3 $\beta$ ), *Adenomatous polyposis coli* (APC),  $\beta$ -catenina e *casein kinase 1* (CK1) é inativado, permitindo que a  $\beta$ -catenina seja translocada do citoplasma para o núcleo, mediada pela galectina 3 (Gal-3), onde se liga aos fatores de transcrição TCF/LEF para promover a ativação da transcrição de genes alvos tais como *c-MYC*, *CCND1* e *MMP7* (SHIMURA *et al.*, 2004; DAKENG *et al.*, 2012). Para que isso ocorra, a proteína Wnt deve se ligar ao receptor FZ na célula-alvo e promover o recrutamento da proteína Dishevelled (Dsh) próximo à membrana plasmática, onde interage com o receptor FZ, etapa essencial para inibir o complexo de destruição da  $\beta$ -catenina. Em relação aos receptores LRP, na presença de Wnt ativadoras, LRP 5 e 6 são fosforilados por GSK3 $\beta$  e CK1, o que também promove o recrutamento de proteínas Dsh bem como a translocação da axina para a membrana plasmática e a inativação complexo de destruição (KLAUS; BIRCHMEIER, 2008).

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

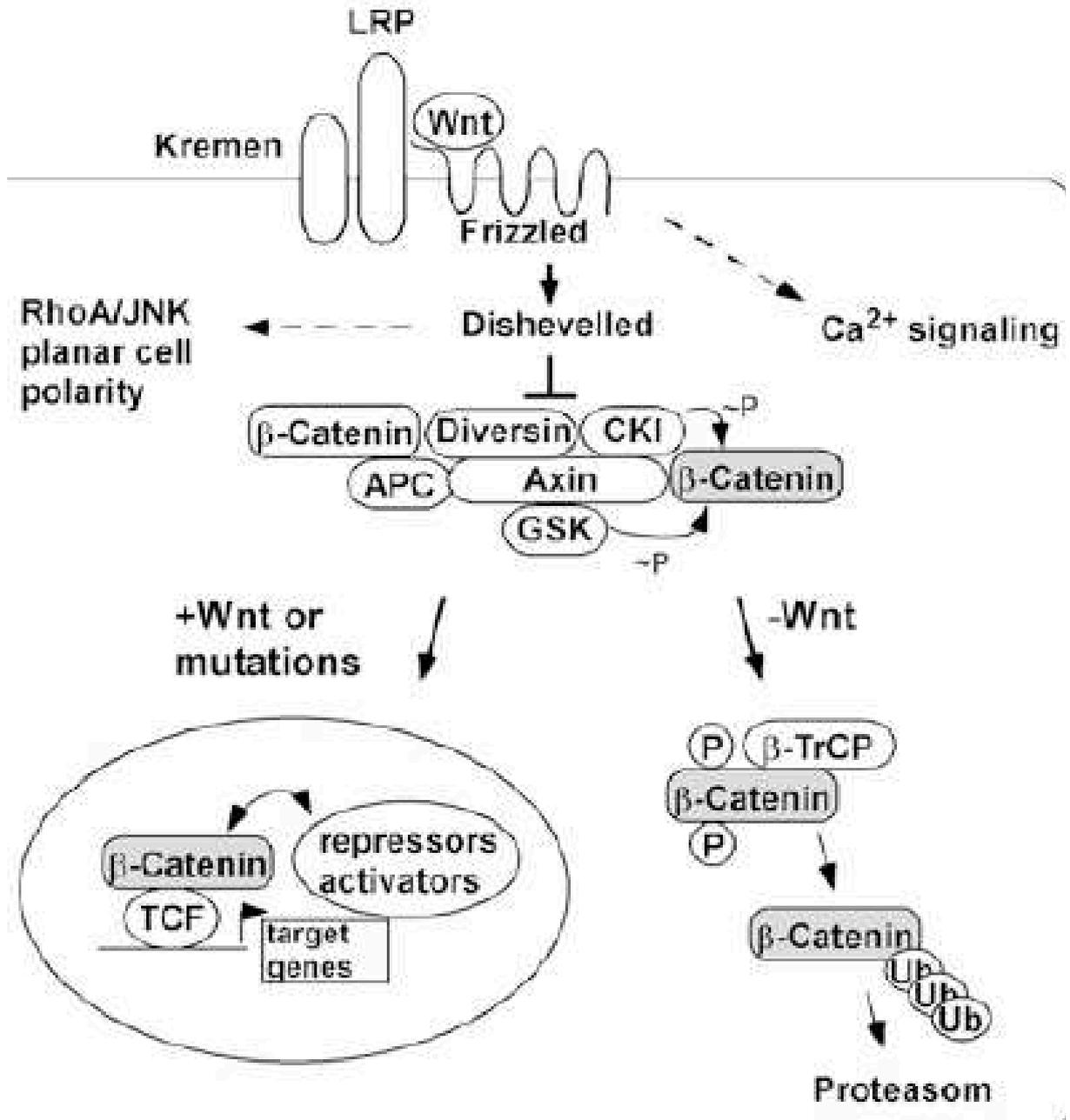


FIGURA 3 – Desenho esquemático da via canônica de sinalização WNT. Pelo esquema, pode-se observar que após a ligação das proteínas Wnts aos receptores Frizzled, ocorre ativação (recrutamento) da proteína Dishevelled que bloqueia a função do complexo proteico estruturado sobre as proteínas AXINA ou Conductina. Na ausência das Wnts (-Wnt) o complexo multiproteico Axina /Conductina promove fosforilação de β-catenina através da GSK3β. A β-catenina fosforilada se torna multi-ubiquitinada (Ub) e subsequentemente degradada via proteossomo. Na presença de Wnts ou após mutações em APC, Axina/Conductina, ou β-catenina, a fosforilação e degradação de β-catenina é bloqueada o que permite a associação de β-catenina com os fatores de transcrição TCF (+ Wnt or mutations). Os complexos TCF/β-catenina se ligam ao DNA e ativam os genes alvo de Wnt juntamente com outros ativadores ou repressores transcricionais.

Fonte: Lustig e Behrens (2003).

### 2.3 Caracterização dos principais componentes da via Wnt e seu papel no câncer

Estudos recentes em modelos experimentais e em neoplasias humanas têm mostrado que a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina está alterada durante a tumorigênese. Este envolvimento tem sido percebido pelas alterações associadas a funções de  $\beta$ -catenina que ocorrem quando há mutações nos genes *APC*, *GSK-3 $\beta$* , *AXINA* ou no exon 3 do gene da  $\beta$ -catenina, comprometendo o sítio de fosforilação da GSK-3 $\beta$  (SATO *et al.*, 2002; URAGUCHI *et al.*, 2004). Assim, componentes da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina têm sido relatados como fatores que contribuem para gênese de diferentes neoplasias como carcinoma hepatocelular, meduloblastoma, melanoma, câncer de ovário, próstata, pâncreas, de cólon e em tumores de glândulas salivares (ACTIS *et al.*, 2002; DAA *et al.*, 2004; KUDO *et al.*, 2004).

#### 2.3.1 GSK 3 $\beta$ :

A proteína quinase serina/treonina GSK3 $\beta$  foi descoberta há aproximadamente três décadas no músculo esquelético de coelhos, como uma proteína que inativa a glicogênio sintase, que é a enzima final na biossíntese do glicogênio (EMBI *et al.*, 1980; WOODGETT, 1990; MISHRA, 2010). Está constitutivamente ativa em células normais e envolvida em muitos processos celulares, tais como o metabolismo de glicogênio, regulação do citoesqueleto, estabilidade dos microtúbulos e controle do ciclo celular (LUO, 2009).

Por ser uma proteína multifuncional, ou seja, participar de várias vias de sinalização regulando muitas proteínas chaves, como, por exemplo, a  $\beta$ -catenina na via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, quando desregulada, pode estar envolvida no desenvolvimento de várias doenças como câncer, diabetes, cardiovasculopatias e desordens degenerativas (JOPE; YUSKAITIS; BEUREL, 2007). A atividade da GSK3 $\beta$  é regulada pela fosforilação sítio-específica. Na sua forma inativa, a GSK3 $\beta$  é fosforilada no resíduo de serina na posição 9 (Ser9), enquanto que na sua forma ativa é fosforilada no resíduo de tirosina na posição 216 (Tyr216), aumentando a sua atividade enzimática em aproximadamente cinco vezes (LUO, 2009).

No citoplasma, a proteína GSK3 $\beta$  ativada participa de um complexo multiproteico formado pela Axina, APC e CK1. Neste processo, sua função está associada à promoção da degradação da proteína  $\beta$ -catenina via complexo de destruição ubiquitina-proteossomo, fosforilando-a e marcando-a com ubiquitina pela proteína  $\beta$ -TrCP (CLEVERS, 2006). Por outro lado, quando a GSK3 $\beta$  é inativada, o complexo multiproteico deixa de fosforilar a  $\beta$ -

catenina que, por consequência, não é degradada e o seu nível citoplasmático aumenta, culminando com a sua translocação ao núcleo (CLEVERS, 2006). No núcleo,  $\beta$ -catenina se liga a fator de transcrição da TCF/LEF promovendo a transcrição de genes alvo da via de sinalização Wnt/  $\beta$ -catenina, tais como os genes *MYC*, *CCND1*, *JUN*, *MMP1* e *MMP7* (FARAGO *et al.*, 2005; LUSTIG; BEHRENS, 2003).

Além de seu envolvimento nas funções celulares normais, estudos recentes têm observado que a proteína GSK3 $\beta$  tem participação direta nos processos de transformação neoplásica, crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases (DOBLE; WOODGETT, 2007; LUO, 2009; MISHRA, 2010). GSK3 $\beta$  atua como uma potencial proteína supressora de tumor na via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, uma vez que sua inibição na via promove a estabilização de  $\beta$ -catenina e seu acúmulo e consequente translocação para o núcleo, levando à ativação da expressão de oncogenes tais como *CCND1*, *MYC* e *c-JUN* (JOPE *et al.*, 2007).

Considerando que a possibilidade de inibição de GSK3 $\beta$  pode contribuir para tumorigênese, é particularmente interessante o fato de não ter sido encontradas mutações em *GSK3 $\beta$*  em cânceres humanos. Isso pode ser explicado pelo fato de cada isoforma de GSK3 $\beta$  ser codificada por um gene diferente e que mutações espontâneas em ambos os genes aparecerem com raridade. Assim, o envolvimento de GSK3 $\beta$  na tumorigênese está relacionado com desregulação em sua atividade e não com mutações de inativação, como já foi encontrado em alguns cânceres humanos para os genes codificadores de  $\beta$ -catenina ou APC na via de sinalização Wnt/  $\beta$ -catenina (POLAKIS, 1999; SAMUELS; ERICSON, 2006; JOPE *et al.*, 2007).

Evidências mostram que a inativação de GSK3 $\beta$  também está relacionada com crescimento tumoral e metástase. Neste sentido, a forma ativa de GSK3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ - Tyr<sup>216</sup>) foi mais frequentemente encontrada em carcinomas gástricos nos estágios iniciais e apresentou uma relação negativa com metástase nodal. Além disto, foi positivamente associada ao melhor prognóstico, sendo candidata a biomarcador prognóstico em câncer gástrico (CHO *et al.*, 2010).

Sobre este último papel, é de amplo conhecimento que aumento da motilidade e invasão das células cancerosas são os eventos que ocorrem primariamente no processo de metástase, um fenômeno conhecido como transição epitélio-mesênquima (LUO, 2009). De um modo geral, as caderinas interagem com a actina do citoesqueleto para manter a integridade dos tecidos. Todavia, nos carcinomas, a perda de E-caderina favorece a invasão das células, pelo favorecimento do rompimento da adesão intercelular (MISHRA, 2010).

O fator de transcrição Snail tem um papel fundamental na transição epitélio-mesênquima através da supressão da expressão de E-caderina. Nas células tumorais, GSK3 promove a degradação de Snail e a inibição de GSK3 $\beta$  causa o aumento da atividade de Snail e consequente regulação negativa de E-caderina. Assim, há a inibição da transcrição do gene *CDH1*, responsável por codificar a proteína E-caderina, proporcionando um aumento da invasão e metástase (JOPE *et al.*, 2007). Por fim, cabe mencionar que moléculas da matriz extracelular implicadas com a progressão de CCEB, como colágeno, fibronectina, tenascina, laminina e integrinas, são também alvos indiretos da GSK3 $\beta$  via proteína Snail, o que reforça ainda mais o seu papel do desenvolvimento de metástase (MISHRA, 2010).

### 2.3.2 APC

O gene *APC* é um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 15q21-22 e codifica uma proteína citoplasmática denominada APC. APC é o acrônimo para o nome da doença polipose adenomatosa do cólon, do inglês *Adenomatous Poliposis Coli*, no qual o gene foi descrito pela primeira vez (ANASTAS; MOON, 2013).

No contexto da via Wnt/ $\beta$ -catenina, a proteína APC é capaz de se ligar a  $\beta$ -catenina, atuando na formação do complexo que favorecerá a degradação da  $\beta$ -catenina (TSUCHIYA *et al.*, 2004). Mutações que eventualmente estejam envolvidas com o gene *APC* levam a produção de uma proteína anômala, incapaz de ligar-se à  $\beta$ -catenina, interferindo no processo de fosforilação mediada pela GSK-3 $\beta$  e, consequentemente, sua degradação via proteassomo. Como já descrito anteriormente, esta alteração tornará a  $\beta$ -catenina estável no citoplasma, aumentando a possibilidade de transcrição de genes alvos da via Wnt/ $\beta$ -catenina (IWAI *et al.*, 2005).

Em alguns tumores, tais como hepatocarcinomas, carcinoma de células renais e os carcinomas de pulmão, as alterações em expressão de APC ou mutações no gene *APC* têm sido observadas (BRABENDER *et al.*, 2001; OHGAKI *et al.*, 2004). No estudo de Gray *et al.* (2011) uma redução da expressão de APC em 95% das amostras de carcinomas epidermóides de pele foi encontrada sendo que 60% delas apresentavam LOH para o gene *APC*. Em carcinomas epidermóides de laringe, foi encontrado LOH para o gene *APC* em 20% dos casos e mutações no éxon 11 do mesmo gene em 33% (PECINA-SLAUS *et al.*, 2005). PENG *et al.* (2009) estudaram a expressão da proteína APC em carcinomas epidermóides de esôfago, em relação à mucosa normal, células hiperplásicas e displásicas. Em seu estudo, os autores observaram uma redução da expressão da proteína APC de um estado normal a neoplásico.

Ainda, mutações em APC também foram identificadas em outras neoplasias, como adenomas gástricos, hepatoblastomas e carcinoma de próstata (ODA *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2002; MIYAKI *et al.*, 1999; GERSTEIN *et al.*, 2002). Esses dados mostram que alterações no gene APC, que de certa forma é refletido na expressão da sua respectiva proteína dentro da célula, parece estar relacionado com desenvolvimento de diferentes tipos de tumores, inclusive os carcinomas de células escamosas de cavidade bucal.

Também, a proteína APC pode se ligar a várias outras proteínas e exercer diferentes funções em diferentes compartimentos subcelulares (LUSTIG; BEHRENS, 2003). Vários sinais de importação celular (SIC) e sinais de exportação celular (SEC) estão associados à APC. No total, cinco SEC foram identificados, dois deles localizados na porção N-terminal, e os outros três próximos ao centro entre os domínios de ligação de  $\beta$ -catenina (HENDERSON; FAGOTTO, 2002; LUSTIG; BEHRENS, 2003). Os SEC N-terminais parecem estar bem conservados e, devido sua localização, estão presentes e funcionando em cânceres de cólon. O papel funcional dos diferentes SEC, e, em particular, sua relativa importância para exportação de APC para o núcleo constitui-se, ainda, um assunto controverso. APC pode sim transitar entre citoplasma e núcleo e foi proposto que deleções das SEC centrais (próximas aos domínios de  $\beta$ -catenina) de APC em tumores levam a um sequestro das proteínas APC anômalas e de  $\beta$ -catenina para dentro do núcleo. Porém há evidências de que a  $\beta$ -catenina pode transitar entre núcleo e citoplasma independente de APC. Contudo, ainda há controvérsia se a função de exportação nuclear de APC é crucial para sua função como supressor de tumor (HENDERSON; FAGOTTO, 2002; LUSTIG; BEHRENS, 2003).

### 2.3.3 $\beta$ -Catenina

Na ausência de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, a  $\beta$ -catenina está associada à E-caderina nos complexos juncionais e suas concentrações citosólicas são mantidas baixas por sua ubiquitinação e degradação via proteassomo (LI *et al.*, 2012). Também, a sua ligação à APC fosforilada, a sua fosforilação via GSK3 $\beta$  e o complexo de formação Axina/conductina/CK1-dependente são responsáveis pela degradação contínua de  $\beta$ -catenina no citoplasma (BEHRENS *et al.*, 1993; KORINEK *et al.*, 1997; IKEDA *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2012).

Quando da ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina, a  $\beta$ -catenina regula a atividade de transcrição de genes após a sua translocação para o núcleo e a ativação de fatores de transcrição (MOLENAAR *et al.*, 1996; SIMIC *et al.*, 2013).

Uma vez que vários tipos de tumor foram relacionados à alta expressão de genes alvo de  $\beta$ -catenina, esta proteína tem sido usada como um biomarcador em vários tipos de cânceres. Por exemplo, expressão nuclear de  $\beta$ -catenina parece ser um critério para percepção de perfis invasivos e de disseminação de carcinomas bem diferenciados. Nestas lesões, a  $\beta$ -catenina ainda é encontrada associada a E-caderina, estando expressa no citoplasma de células diferenciadas e com a união intercelular preservada (BRABLETZ *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2013).

Mutações no gene da  $\beta$ -catenina têm sido descritas em vários tipos de tumor. Análise de tumores colorretais não relacionados à polipose hereditária mostrou uma frequência elevada de mutações (43%) em *CTNNB1*, todas em locais de reparo do gene. (LOVIG *et al.*, 2002). Mutações em *CTNNB1* também foram encontradas em carcinomas hepatocelulares (de LA COSTE *et al.*, 1998; KOCH *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2001; TANIGUSHI *et al.*, 2002); em carcinomas de endométrio (MIRABELLI-PRIMDAHL *et al.*, 1999) e câncer de próstata (VOELLER *et al.*, 1998).

Quanto à localização nuclear de  $\beta$ -catenina, esta foi primeiramente constatada em adenomas colorretais (INOMATA *et al.*, 1996). Em seguida foi demonstrado que a marcação nuclear para  $\beta$ -catenina em cortes de tecido parafinado nem sempre coincide com a ativação da via Wnt, sendo a expressão nuclear de  $\beta$ -catenina heterogênea. Particularmente, a imunolocalização de  $\beta$ -catenina em carcinomas de cólon mostrou-se intensa nas áreas de *front* invasivo do tumor; nas demais partes do tumor, a  $\beta$ -catenina foi expressa em citoplasma e membrana apenas. Isso pode indicar que altos níveis de  $\beta$ -catenina nuclear tem um importante papel na transição para o estado invasivo das células tumorais, e mais, aponta mecanismos regulatórios que controlam o aumento de expressão nuclear de  $\beta$ -catenina independente da via Wnt. Pode-se especular que sinais vindos do estroma vizinho ao tumor invasor possam desempenhar um papel na modulação da translocação nuclear de  $\beta$ -catenina (BRABLETZ *et al.*, 2002; LUSTIG; BEHRENS, 2003).

A participação de  $\beta$ -catenina e sua associação com a adesão celular e tumorigênese foi demonstrada em vários trabalhos para vários tumores, entre os quais citam-se: carcinoma de cólon e reto (RUBINFELD *et al.*, 1996), meduloblastoma (THOMPSON *et al.*, 2006; CHO *et al.*, 2011) e leucemia mieloide aguda (WANG *et al.*, 2010).

## 2.4 A Via WNT e o Carcinoma de células escamosas bucal

Falando especificamente dos CCEB, há poucas informações na literatura científica sobre a participação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina no desenvolvimento e progressão desses tumores. Muitos dos estudos avaliam o papel isolado da principal molécula efetora dessa via, a  $\beta$ -catenina, em especial correlacionando-a com fatores clinicopatológicos. Contudo, os resultados são ainda contraditórios. Alguns estudos demonstraram que células positivas para Wnt apresentavam concomitantemente alta expressão de  $\beta$ -catenina difusamente no citoplasma e núcleo, bem como de c-Myc e MT1-MMP (URAGUCHI *et al.*, 2004); por outro lado, baixa expressão de  $\beta$ -catenina tem sido observada em CCEB metastáticos quando comparado com as células de tumores não metastáticos (KUDO *et al.*, 2004). Ainda, estudos têm mostrado uma relação entre reduzida expressão de  $\beta$ -catenina com grau histológico do tumor, fenótipo agressivo, pior prognóstico e risco aumentado para invasão e metástase (LAXMIDEVI *et al.*, 2010; RAVINDRAN; DEVARAJ, 2011). Além disso, alguns trabalhos têm observado que o acúmulo intracelular de  $\beta$ -catenina ocorre nos estágios iniciais do processo de carcinogênese bucal, de forma semelhante ao que já foi descrito para a carcinogênese do cólon (BRABLETZ *et al.*, 2000; SATO *et al.*, 2002). Em um estudo analisando carcinomas de cabeça e pescoço, foi sugerido que a  $\beta$ -catenina tem um papel importante no complexo de adesão celular e menor como molécula sinalizadora nesses tipos de tumores (YU *et al.*, 2005). No estudo de LAXMIDEVI *et al.* (2010), a expressão de  $\beta$ -catenina no citoplasma relacionou com grau histológico menos diferenciado de CCEB e, como consequência, maior agressividade tumoral. Contudo, isso parece não ser sempre o caso visto que outro estudo mostrou que a expressão de  $\beta$ -catenina não estava correlacionada com invasão tumoral, as características da metástase para linfonodos regionais e o grau histológico, embora uma reduzida expressão dessa molécula tenha sido associada à metástase linfonodal (TANAKA *et al.*, 2003).

Assim, embora os estudos sugiram um importante papel para  $\beta$ -catenina em alguns aspectos relacionados com progressão tumoral, os mecanismos moleculares não são ainda completamente compreendidos e outros estudos são necessários.

Outro componente importante da via de sinalização Wnt/  $\beta$ -catenina, mas que ainda é pouco estudado no contexto da carcinogênese bucal é a proteína quinase de glicogênio sintase 3 $\beta$  (GSK3- $\beta$ ). Estudos sobre a expressão de GSK3 $\beta$  em adenocarcinomas ovarianos e carcinomas de cavidade bucal, por exemplo, têm mostrado que a sua expressão está aumentada (GOTO *et al.*, 2002; RASK *et al.*, 2003). Contudo, o papel da GSK3- $\beta$  na

carcinogênese bucal é desconhecido, embora estudos em modelos de tumorigênese de mama bem como de carcinogênese de pele imputem-lhe papel oncogênico (FARAGO *et al.*, 2005; LEIS *et al.*, 2002). No estudo de Leis *et al.* (2002) foi mostrado que durante o processo de carcinogênese de pele, a atividade de GSK3 $\beta$  diminuiu à medida que o grau histológico das lesões progredia, sendo maior a expressão de GSK3 $\beta$  em um estágio inicial, ou seja, com desenvolvimento de papilomas, do que em estágios mais avançados, na presença de carcinomas. Ao mesmo tempo, essa reduzida atividade foi acompanhada de aumento da expressão por imuno-histoquímica de GSK3 $\beta$ Ser9, ou seja, a forma inativa de GSK3 $\beta$  bem como acúmulo nuclear de ciclina D1. Esses dados sugerem que GSK3 $\beta$  inativa induz um aumento da expressão de ciclina D1 nuclear e, por consequência, leva a ativação da proliferação celular. Embora os estudos permitam supor que a GSK3 $\beta$  esteja envolvida com o desenvolvimento de tumores bem como a progressão tumoral, não há ainda na literatura nenhum estudo que avalie o papel dessa molécula nos CCEB como na associação da sua expressão com fatores clinicopatológicos de importância prognóstica.

A proteína APC bem como o *status* do gene tem sido investigada em CCEB. Estudos de Chang *et al.* (2000) e Iwai *et al.* (2005) em CCEB revelaram LOH em APC como o principal mecanismo de redução intracelular da proteína. Trabalhando com oito linhagens celulares tumorais e 50 amostras de lesão de CCEB, Uesugi *et al.* (2005) observaram, por imuno-histoquímica, uma redução de 30% na expressão da proteína APC; em duas das oito linhagens celulares (25%) uma hipermetilação de região promotora do gene foi demonstrado. Não obstante, Gao *et al.* (2005) investigaram, além de LOH, a hipermetilação do gene promotor APC. Nesse estudo, eles observaram que 4/31 (12,9%) e 5/34 (14,7%) das amostras de carcinoma apresentaram, respectivamente, LOH e hipermetilação do gene alvo. No entanto, diferentemente dos estudos de Tsuchiya *et al.* (2004), o grau de diferenciação do tumor não foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o tipo de alteração do gene.

Alterações em componentes da via Wnt/ $\beta$ -catenina já foram descritas em desordens (ou alterações) cancerizáveis da mucosa oral, tanto para lesões cancerizáveis, isoladamente, quanto na dinâmica da transformação maligna a partir das lesões displásicas. Isso foi demonstrado por Ishida e colaboradores (2007), que encontraram expressão nuclear de  $\beta$ -catenina em 92% dos casos de leucoplasias com displasia e em 29% das leucoplasias sem displasia. Também observaram que a expressão nuclear de  $\beta$ -catenina aumentou de maneira significativa com a severidade das displasias. Por fim, nesse mesmo estudo, os autores

observaram que a expressão Wnt-3 e ciclina D1 (CCND1) era significativamente maior nos casos com expressão nuclear da  $\beta$ -catenina. Os autores concluíram que a ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é importante na progressão das displasias nas leucoplasias bucais (ISHIDA *et al.*, 2007). Um estudo do nosso grupo de pesquisa (BARBOSA DE PAULO, 2016) mostrou evidências de que a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina não esteja ativa no processo de evolução e transformação das leucoplasias bucais. Barbosa de Paulo (2016) observou que a redução da expressão gênica de *CCNTB1*, *CDH1* e *APC* realmente parecem ser um evento importante na progressão da displasia epitelial e transformação maligna de lesões leucoplásicas e que o aumento da expressão gênica de *CCND1* em leucoplasias de alto risco sugere maior potencial de proliferação celular e logo pior prognóstico para a doença. Todavia, não demonstrou aumento de  $\beta$ -catenina nuclear nos casos de câncer, como deveria ser observado nos casos de ativação da via clássica. Estes resultados somam-se aqueles da literatura que colocam dúvidas ainda na ativação da via na carcinogênese bucal.

Nesse sentido, outros estudos concernentes ao papel da via e do seu principal mediador  $\beta$ -catenina, além da proteína GSK3-beta e proteína APC e demais proteínas alvos, são essenciais para elucidar os mecanismos envolvidos na patogênese desse importante tumor de cabeça e pescoço e correlacionar com fatores de prognóstico.

### 3 JUSTIFICATIVA E PROPOSIÇÃO

A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é conhecida por estar envolvida na transformação maligna de diferentes tipos celulares e, em especial, em cólon. Dentre os componentes dessa via, destaca-se a beta-catenina, uma proteína efetora que atua na ativação transcricional de vários genes como o da ciclina D1 e c-myc, ambos considerados importantes marcadores de proliferação celular. Não menos importante nesse intrincado mecanismo de sinalização celular e, no caso, da via de sinalização Wnt/  $\beta$  -catenina, tem a proteína APC. Essa proteína juntamente com a GSK3 $\beta$  e axina formam um complexo de destruição da beta-catenina na ausência do sinal Wnt.

Assim, estudar a expressão gênica e proteica dos componentes efetores pertencentes a essa via de sinalização (GSK-3 $\beta$ , APC e  $\beta$  -catenina) bem como as alterações na expressão gênica e proteica de marcadores de proliferação e adesão celular que possam ocorrer em virtude da ativação dessa via (c-Myc, ciclina D1 e E-caderina) é crucial para o entendimento do processo de início e desenvolvimento de tumores e, em especial, no que diz respeito a um dos tumores de cabeça e pescoço de maior incidência, o carcinoma de células escamosas de boca (CCEB).

Embora estudos anteriores tenham procurado estudar os componentes proteicos dessa via de sinalização em amostras de CCEB de forma isolada, não há ainda nenhum estudo que estude em conjunto a expressão dessas proteínas chaves e sua correlação com fatores de prognósticos bem estabelecidos na literatura para esse tipo de lesão.

Nesse sentido, a avaliação da expressão dessas proteínas em uma amostra de conveniência de CCEB poderá dar novos subsídios para a compreensão dos mecanismos relacionados com o seu desenvolvimento e a progressão tumoral.

Nossa hipótese de trabalho é que a via Wnt/ $\beta$ -catenina está ativa na carcinogênese bucal e na progressão do câncer de boca, traduzido pelo aumento de  $\beta$ -catenina nuclear; acreditamos também que nestas lesões teremos uma menor expressão de E-caderina, de forma marcante nas amostras de lesões metastáticas.

## 4 OBJETIVOS

### Geral

Identificar o padrão de transcrição de genes pertencentes a via de sinalização WNT bem como os seus respectivos produtos proteicos fosforilados e não fosforilados em uma amostra de CCEB metastático e não metastático obtidos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia e Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia e relação da expressão deles com fatores clinicopatológicos.

### Específicos

1. Tabular e descrever os dados clinicopatológicos da amostra de CCEB de pacientes metastáticos e não metastáticos;
2. Quantificar a expressão gênica dos genes *GSK-3 $\beta$* , *APC*, *CTNNB1*, *c-Myc*, *CCND1* e *CDH1* em fragmentos cirúrgicos de pacientes com diagnóstico de CCEB.
3. Avaliar a expressão das proteínas GSK-3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC,  $\beta$ -catenina, c-Myc, ciclina D1 e E-caderina em fragmentos parafinados de pacientes com CCEB e grupo controle;
4. Avaliar a expressão das proteínas GSK-3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC,  $\beta$ -catenina, c-Myc, ciclina D1 e E-caderina em fragmentos parafinados de CCEB de pacientes metastáticos e não metastáticos;
5. Associar a expressão das proteínas GSK-3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC,  $\beta$ -catenina, c-Myc, ciclina D1 e E-caderina com fatores clinicopatológicos na amostra de CCEB de pacientes metastáticos e não metastáticos.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (CAAE: 00593312.1.0000.5152), segundo o parecer de número 5715/12 (ANEXO A e B).

### 5.1 Casuística

Foram incluídas no estudo 90 casos de CCEB, cujos fragmentos teciduais provenientes de biopsias incisionais ou excisionais, foram fixados em formalina (solução de formol a 10%) e incluídos em parafina, e outros 17 casos, dos quais se utilizou fragmentos de tecido fresco, não fixados. Os fragmentos fixados foram coletados retrospectivamente dos Arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia e Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFU no período de janeiro de 2006 a fevereiro de 2013; as amostras coletadas prospectivamente foram obtidas de casos tratados cirurgicamente no Hospital de Clínicas da UFU no período entre janeiro de 2013 a dezembro de 2014 foram usadas no estudo. Todos os casos incluídos estavam dentro da codificação CID: C00 a C06, C09 e C10. Foram ainda considerados dois outros grupos para o estudo: um grupo controle utilizado para os ensaios imuno-histoquímicos e sua análise (n = 16), constituído de fragmentos de mucosa, cujos epitélios de revestimento eram destituídos de displasia ou neoplasia benigna ou maligna; e outro grupo controle utilizado para o experimento de expressão funcional gênica (n = 11), constituído de fragmentos de mucosa de bochecha doados por indivíduos saudáveis, e de mucosas aparentemente normais, adjacentes a mucoceles tratadas por exérese na Unidade de Diagnóstico Estomatológico da Faculdade de Odontologia da UFU.

Todos os casos incluídos no estudo tiveram suas lâminas histológicas revistas para confirmação do diagnóstico de CCEB conforme os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (BARNES *et al.*, 2005), e para confirmação da ausência de neoplasias e displasias ou outras alterações histopatológicas que pudessem comprometer a qualidade dos controles..

A inclusão dos casos para o trabalho levou em consideração as lesões categorizadas segundo os CIDs descritos anteriormente. Os critérios de exclusão foram a ausência de material tecidual em quantidade suficiente para os ensaios, principais dados sociodemográficos e clinicopatológicos incompletos e perda de seguimento do paciente.

Informações sociodemográficas e clinicopatológicas dos pacientes participantes foram obtidas a partir de consulta aos prontuários médicos. Todos os dados foram coletados através do uso de um instrumento de coleta qualificado semiestruturado (ANEXO C). As informações relativas às características sociodemográficas dos pacientes, como idade, sexo, cor e comportamentos relacionados à doença (tabagismo e etilismo), e dados clinicopatológicos, como sintomatologia, tempo de evolução, localização, tamanho, estadiamento clínico, gradação histológica, tratamento, metástase, recidiva e condição clínica, foram levantadas.

Para o estadiamento clínico da doença, utilizou-se o sistema estabelecido pela *Union for International Cancer Control* (UICC) e *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (SOBIN *et al.*, 2009), conforme Tabela 1. Para a gradação histológica dos tumores, empregou-se os critérios estabelecidos pela OMS (BARNES *et al.*, 2005), como segue: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado. A presença de metástase locorregional foi inicialmente estabelecida por exames clínicos e de imagem (Tomografia Computadorizada), confirmados posteriormente por exames histopatológicos dos linfonodos coletados durante o esvaziamento cervical do paciente, no transcurso da cirurgia. A confirmação de metástase foi usada para categorizar os pacientes com CCEB em dois grupos: aqueles com tumores primários não metastáticos (PNM) e primários metastáticos (PM) para fins comparativos quanto à expressão das proteínas e genes investigados.

QUADRO 1 – Descrição dos parâmetros para o estadiamento clínico adotado no estudo

ESTÁGIO	CLASSIFICAÇÃO TNM
I	T1N0M0
II	T2N0M0
III	T3N0M0 ou T1, T2, T3 com N1
IV	T4N0M0 ou qualquer T com N2, N3, ou qualquer lesão com M

Fonte: Sobin *et al.* (2009).

## 5.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time PCR, qPCR)

### 5.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os iniciadores ou *primers* foram desenhados com o auxílio da ferramenta de *design de primers* da empresa Integrated DNA Technologies (IDT®), através do link *PrimerQuest® Tool*. Os parâmetros escolhidos foram definidos para *qPCR Intercalating Dyes*, levando em consideração os seguintes fatores: temperatura de *melting* de 60°C, porcentagem de bases GC de 50%, tamanho do primer de 18-22pb, tamanho do *amplicon* de 80 a 100pb e energia livre

de Gibbs ( $\Delta G$ ) baixa (THORNTON; BASU, 2011). As sequências dos genes alvos foram obtidas pelo site da *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Em seguida, para seleção do melhor primer/gene, utilizou-se o site da IDT® e, finalmente o programa *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, tal que *primers* de menor *expect-value* (e-value) foram finalmente selecionados (THORNTON; BASU, 2011). O Quadro 3 detalha os *primers forward* e *reverse* empregados no estudo de acordo com os parâmetros acima mencionados.

QUADRO 2 – Sequência dos primers forward e reverse com suas respectivas referências.

GENE	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA IDT	REFERÊNCIA NCBI
<i>GSK3<math>\beta</math> F</i>	CTACCATCCTTATTCCTCCTCA	128954099	NM_001146156.1
<i>GSK3<math>\beta</math> R</i>	GTCCACGGTCTCCAGTATTA	128954100	NM_001146156.1
<i>APC F</i>	GCCCTAGAAGCAGAATTAGATG	129829704	NM_001206729.1
<i>APC R</i>	CTTACTACGATGAGATGCCTTG	129829705	NM_001206729.1
<i>CNNTB1 F</i>	CCAGGTGGTGGTTAATAAGG	128954095	NM_001243027.2
<i>CNNTB1 R</i>	CTGAGGAGAACGCATGATAG	128954096	NM_001243027.2
<i>c-MYC F</i>	CTGCTTAGACGCTGGATTT	128954098	NM_00507111.5
<i>c-MYC R</i>	CGAGGTCATAGTTCCTGTTG	128954098	NM_00507111.5
<i>CCND1 F</i>	CCACAGCTACTTGGTTTGT	128954097	NM_004958.3
<i>CCND1 R</i>	CCTACACCTATTGGACTGAAAG	128954097	NM_004958.3
<i>CDH1 F</i>	GTCAGCTACTCTAGTTCTGTTG	128954089	NM_006218.2
<i>CDH1 R</i>	GGACACACCAGTGTAATG	128954090	NM_006218.2
<i>B2M F</i>	TATCCAGCGTACTCCAAAGA		NM_004048.2
<i>B2M R</i>	GGATGAAACCCAGACACATAG		NM_004048.2

Fonte: dados da pesquisa

### 5.2.2 Extração de RNA

As extrações de RNA de todas as amostras congeladas (mucosa normal e amostra tumoral [PMN e PM]) congeladas foram realizadas no aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) juntamente com o kit de extrações de RNA Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue Kit (Referência: AS1280, Promega, Madison, WI, USA). Todas as etapas seguiram as recomendações do fabricante, bem como todas as soluções utilizadas disponíveis no kit. Em resumo, após a pesagem (máximo de 0,05g), cada amostra foi macerada em ambiente refrigerado em meio contendo 200  $\mu$ L da solução de trabalho (1mL de solução de homogeneização para cada 20 $\mu$ L de 1-tioglicerol) com auxílio do Pellet Pestles® (Sigma Aldrich Brasil Ltda. São Paulo, Brazil). Seguida a aplicação de 200 $\mu$ L de tampão de lise, as amostras foram agitadas em vortex por 15 segundos, centrifugadas a 1000xg por 2 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados (400 $\mu$ L) e colocados nas *cartridges* (suporte disponível no kit), posteriormente foram colocadas dentro do aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA)

para extração dos RNA. Ao final, o RNA total eluído de cada amostra foi alíquotado e posteriormente quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® ND1000, utilizando a relação 260/280 (índice de absorbância variando de 1,6 a 2,1) e 260/230 (índice de absorbância variando de 1,9 a 2,4). Todos os RNA foram armazenados em freezer -80°C até a transcrição reversa.

### 5.2.3 *Transcrição reversa*

Utilizou-se o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Referência: A5001, Promega, Madison, WI, USA) para a síntese de DNA complementar (cDNA). Todas as etapas foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, para cada amostra, 7µL de Primer Mix (1µL de Oligo DT, 1µL de Random Primer e 5µL de RNA total foi incubado a 70°C por 5 minutos) e 13µL de RT Mix (5µL de água livre de RNAe, 4µl de 5X Reaction Buffer, 1µL de dNTP Mix, 1,5µL de MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), 0,5µL de RNAsin e 1µL de Enzima RT) foram misturados e incubados em termociclador por uma hora a 42°C e então por 10 minutos a 70°C para a desnaturação da enzima transcriptase reversa. Ao final, o cDNA/amostra foi alíquotado, quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® ND1000 (índices de absorbância variando de 1,6 a 2,1 para os índices 260/280 e de 1,9 a 2,1 para os índices 260/230) e armazenado em freezer -20°C até a utilização para *qPCR*.

### 5.2.4 *qPCR*

A quantificação da expressão dos genes *GSK3β*, *APC*, *CCTBN*, *c-MYC*, *CCND1* e *CDH1* foram realizados no aparelho StepOnePlus™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) por meio do método comparativo de *threshold cycles* (Ct). Todos os experimentos realizados foram montados em placas de 96 poços MicroAmp® Fast Optical, 0,1mL (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Para montagem dessas placas de 96 poços, empregou-se o StepOne Software versão 2.1 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Todos experimentos foram conduzidos em duplicata com apenas um controle negativo para cada gene. As condições da reação foram determinadas em ciclos previamente padronizados de 95°C por dois minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Para determinação da curva de *melting*, empregaram-se ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. A reação teve um tempo total de corrida de aproximadamente duas horas.

Para a reação, utilizou-se o GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (Referência: A6001, Promega, Madison, WI, USA), que contém sondas com propriedades espectrais semelhante ao SYBR<sup>®</sup> Green I com excitação a 493nm e emissão a 530nm. As proporções dos reagentes utilizados no mix para cada amostra foram as seguintes: 6µl de GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix, 0,5µL de *primer forward*, 0,5µL de *primer reverse* e 3,1µL de água livre de RNAe, totalizando 10,1µL de mix em cada poço. A quantidade de cDNA utilizada foi de 1,9µL (200ng de cDNA), totalizando em cada poço 12µL de solução.

A expressão relativa ótima de cada gene foi estabelecida através da normalização do *q-PCR* em relação ao gene endógeno *β2-microglobulina (B2M)* (Tabela 4), pois foi o gene que teve os menores índices de variações entre as amostras. O modelo matemático adotado para a avaliação da expressão relativa (*r*) entre o gene alvo e o gene endógeno foi através da diferença entre os valores de Ct do gene endógeno e dos valores de Ct do gene alvo ( $\Delta Ct = Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ do gene endógeno}$ ) sem considerar a correção da eficiência (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). A partir dos valores de  $\Delta Ct$  dos grupos PM e PNM, foi possível ainda subtrair a variação de  $\Delta Ct$  das amostras controles através da média do  $\Delta Ct$  (calibrador) delas, tal que ao final foi obtido o  $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct - \text{calibrador}$ . Para as análises dos resultados finais foram considerados a quantificação relativa pelo método  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  considerando as médias das duplicatas (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; BUSTIN *et al.*, 2009).

### 5.3 Arranjo em matriz de amostras teciduais (Tissue Microarray- TMA)

Para o estudo da expressão (detecção por ensaio imuno-histoquímico, colorimétrico) das proteínas GSK3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC,  $\beta$ -catenina, c-Myc, ciclina D1 e E-caderina empregou-se o arranjo em matriz de amostras teciduais descrita por Kononen *et al.* (1998) conhecida, em inglês, como *Tissue Microarray (TMA)* (FIG. 4). Essa técnica consiste na incorporação de amostras de tecidos diferentes em um bloco de parafina, designado como “bloco de tecido multitumor”. Este procedimento permite o estudo e análise de expressão de marcadores moleculares em larga escala, com grande aproveitamento de material arquivado a partir do emprego de pequena, mas representativa quantidade de tumor, redução de tempo de análise, e custo na sua obtenção, e possibilitando também a uniformização das reações, facilitando assim a análise comparativa dos casos (ANDRADE *et al.*, 2007).

Para cada bloco recuperado, foram selecionadas duas áreas tumorais (duplicata) situadas lateralmente uma a outra, no *front* de invasão, tendo o cuidado para que os cortes contenham células tumorais. Para a definição destas áreas, foram selecionadas duas áreas por corte/lâmina, utilizando-se um microscópio de campo claro (Nikon Eclipse E400, Tokyo, Japão), no aumento de 10x. As duas regiões selecionadas foram então marcadas na lâmina com uma caneta de retroprojeter que serviu de referência para a transferência da área do bloco original para o bloco de TMA.

Para confecção do TMA, utilizou-se o *Core Facilite* (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA), do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo. Assim, a partir do bloco doador, uma agulha de captura de 1,0 mm de diâmetro foi introduzida no bloco doador; em seguida, o material foi transferido para o bloco receptor obedecendo a um padrão de matriz espaçado de precisão com núcleos de um milímetro de diâmetro.

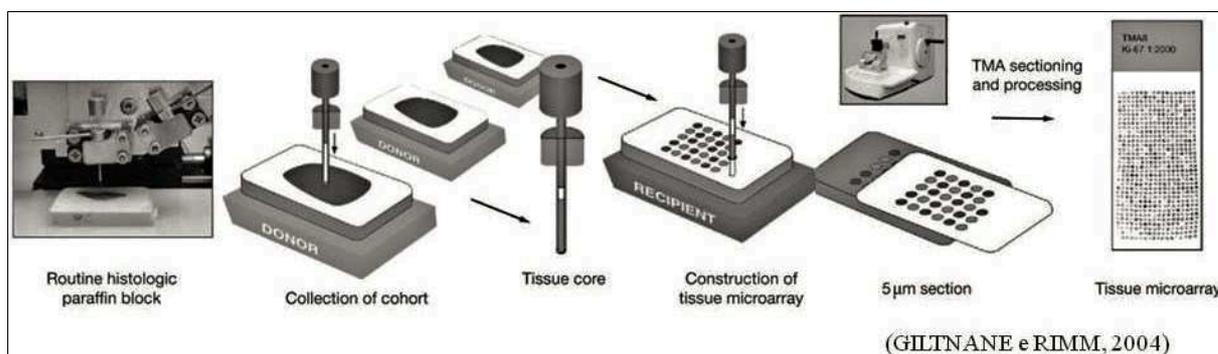


FIGURA 4 – Princípio básico para técnica de construção de matrizes teciduais (TMA). Uma área definida previamente é retirada do bloco doador (*donor*) através de uma “agulha oca”. Esse fragmento é colocado em um bloco receptor (*recipient*). Então o bloco é cortado em micrótomo e processado. Fonte: Giltane e Rimm (2004).

Por fim, o bloco receptor foi cortado e a lâmina confeccionada para os ensaios, sendo que duas dessas lâminas (inicial e final) foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H&E). As demais reservadas para a realização dos ensaios imuno-histoquímicos. A localização de cada amostra tumoral no TMA em duplicata foi devidamente identificada no mapa do TMA (FIG. 5).

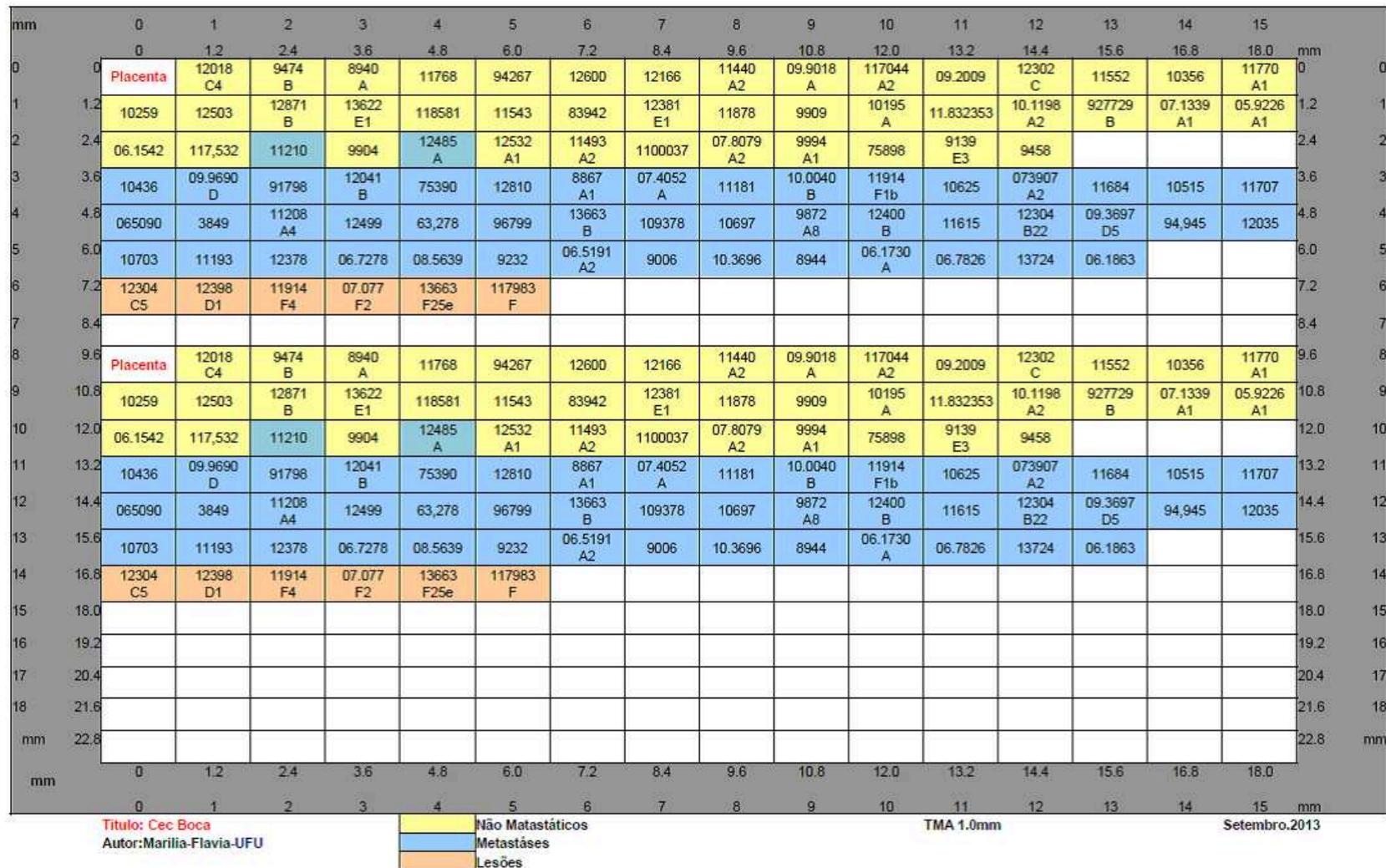


FIGURA 5 – Mapa do TMA confeccionado, indicando a posição de cada caso na lâmina.

Fonte: dados da pesquisa.

#### 5.4 Ensaio imunohistoquímico

A técnica utilizada para identificação da expressão das proteínas GSK3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC,  $\beta$ -catenina, c-myc, ciclina D1 e E-caderina foi a estreptavidina-biotina-peroxidase. As diluições consideradas para cada anticorpo, controle positivos, bem como a referência dos mesmos estão detalhados na Quadro 2.

QUADRO 3 – Anticorpos utilizados nos ensaios imunohistoquímicos.

ANTICORPOS	DILUIÇÃO	ORIGEM	CONTROLE POSITIVO	REFERÊNC IA	CLONE
<b>Anti-GSK3<math>\beta</math></b>	1-1500	IgG monoclonal de Coelho	Carcinoma de cólon	SC <sup>1</sup> -9166	3D10
<b>Anti-pGSK3<math>\beta</math>-Ser9</b>	1-100	IgG policlonal de Coelho	Carcinoma de cólon	SC-11757	
<b>Anti-APC</b>	1-400	IgG policlonal de Coelho	Carcinoma de cólon	SC-896	
<b>Anti-Beta-catenina</b>	1-500	IgG policlonal de Coelho	Carcinoma de mama	SC- 7199	
<b>Anti-c-Myc</b>	1-500	IgG policlonal de Coelho	Cólon normal	SC-788	
<b>Anti-Ciclina D1</b>	1-50	IgG Monoclonal de Coelho	Ca Basocelular	Ab <sup>2</sup> - 16663	SP4
<b>Anti-E-caderina</b>	1-50	IgG Monoclonal de Camundongo	Cólon normal	SC-56527	SPM47 1

<sup>1</sup>SC = Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>, Sta Barbara, CA, USA. <sup>2</sup>Ab = Abcam<sup>®</sup>, Cambridge, UK.

Fonte: dados da pesquisa

Para o ensaio imuno-histoquímico, cortes teciduais de 3 $\mu$ m de espessura obtidos do bloco de TMA foram montados em lâminas polarizadas StarFrost<sup>®</sup> (Knittel Glaser, Brunsvique, Alemanha). Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 85%). Para a remoção do pigmento formólico os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio 10% em etanol 95%, por 10 minutos, em seguida as lâminas passam por sete lavagens em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada de acordo com a padronização do laboratório e recomendações dos fabricantes, utilizando solução tampão EDTA (pH 8.0) em Decloaking Chamber<sup>™</sup> NxGen (Biocare Medical, Concord, CA, USA) com ciclo de 110°C por 15 minutos. Após o resfriamento e lavagem em cinco banhos de água destilada, os cortes foram submetidos primeiramente, ao bloqueio da biotina endógena com solução de clara de ovo, na proporção de duas claras de ovo para 200 mL de água destilada, essa solução é previamente homogeneizada e filtrada e então incubada com as lâminas a 37°C, por 20 minutos, em seguida é necessário 10 lavagens em água destilada, para retirar todo o excesso da solução. Na sequência, deu-se o bloqueio da avidina endógena empregando-se solução de leite em pó desnatado Molico<sup>®</sup> (30g de Molico<sup>®</sup> para 180mL de água destilada) a 37°C, por 20 minutos,

seguido de lavagem com 10 banhos em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10%, em três banhos de 10 minutos cada; após esse bloqueio os cortes foram lavados em cinco banhos de água destilada. Os cortes foram submetidos a três banhos de cinco minutos cada em solução tampão TRIS-HCl (pH 7.4). Depois desses passos os cortes foram incubados com soluções do kit Starr Trek™ Universal HRP Detection System (Referência: STUHRP700, Biocare Medical, Concord, CA, USA). Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida a 37°C, seguindo-se o protocolo: primeira solução utilizada foi a solução de bloqueio *Background Sniper*, por 15 minutos em câmara úmida a 37°C, para bloqueio de ligações inespecíficas, com a remoção do excesso com auxílio de papel filtro; o próximo passo foi a incubação com os anticorpos primários. O tempo de incubação padronizado para os anticorpos foi de duas horas a 37°C.

Na sequência, os cortes foram lavados em solução de TRIS-HCl, em dois banhos de dois minutos cada, e então incubados com a solução *Trek Universal Link* (disponível no kit) contendo anticorpo secundário a 37°C, por 20 minutos. Os cortes foram novamente lavados em TRIS-HCl, em dois banhos de dois minutos cada, e imersos com a solução contendo o complexo terciário *TrekAvidin-HRP* (disponível no kit) a 37°C, por 10 minutos, seguido de lavagem em TRIS-HCl, em dois banhos de dois minutos cada, novamente.

A revelação foi realizada com cromógeno 3-3'-diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB) (disponível no kit) por três minutos. Após esse passo, os cortes foram lavados em água corrente e depois contracolorados com Hematoxilina de Harris. Os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados com auxílio de bálsamo do Canadá. Os controles positivos estão especificados na Tabela 2; a omissão dos anticorpos primários foi utilizada como controle negativo.

## 5.5 Avaliação da Imuno-histoquímica

Para analisar a expressão das proteínas foi utilizado o método semiquantitativo *Quickscore* (Q), considerando a sua média (M) e mediana (m) (DETRE; SCLANI; DOWSETT, 1995). Essa análise leva em consideração dois parâmetros, a saber: intensidade e a proporção de células marcadas, os quais foram aplicados para cada *spot* da lâmina do TMA. Cada *spot* do TMA foi dividido em seis campos, aumento de 400X. Ao final o Q obtido por cada caso/proteína foi dado pela fórmula  $Q = P \times I$ , tal que P representa a porcentagem de células positivas e I intensidade de marcação (I). A distribuição dos *scores* está detalhada na Tabela 1.

TABELA 1 – Distribuição dos scores conforme a porcentagem e intensidade de células marcadas

VARIÁVEIS	CLASSIFICAÇÃO					
Score	1	2	3	4	5	6
Porcentagem (P)	0-4%	5-19%	20-39%	40-59%	60-79%	80-100%
Score	0	1	2	3		
Intensidade (I)	Negativo	Fraco	Moderado	Forte		

Fonte: Detre, Sclani e Dowsett (1995).

## 5.6 Estatística

A descrição dos dados foi realizada a partir de princípios de estatística descritiva, utilizando-se as medidas média, mediana e porcentagens. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para a definição do teste estatístico empregado na análise da imuno-histoquímica, realizou-se a análise de distribuição da amostra por meio do teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Para as análises de múltiplas comparações, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn ou *One Way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Para as análises quanto à expressão imuno-histoquímica e expressão relativa dos genes entre os grupos controles e CEB, empregou-se os testes não pareados bicaudais *U* de Mann-Whitney ou teste *t*. Para análise de sobrevida, empregou-se a curva de Kaplan-Meier e o teste *log-rank* de Mantel-Cox para estimar as diferenças entre elas.

Para todas as análises, foi definido o intervalo de confiança de 95%, sendo considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

Para as análises, os casos foram separados em grupos da seguinte forma: 1) Grupo Controle; 2) Grupo Primário Não Metastático (PNM); 3) Grupo Primário Metastático (PM). As variáveis foram estratificadas da seguinte forma:

- Idade:  $\leq 60$  anos;  $> 60$  anos
- Sexo: masculino e feminino;
- Etilismo: sim/não;
- Tabagismo: sim/não;
- História familiar de câncer: sim/não;
- Localização das lesões: Língua, Assoalho Bucal e Outros;
- Sintomatologia: sim/não;

- Dimensão da lesão:  $\leq 4$  cm;  $> 4$  cm (baseado no sistema de estadiamento clínico TNM onde lesões iniciais T1 e T2 possuem até 4 cm)
- Estágio da doença: estágio inicial (pacientes diagnosticados nos estágios I e II), estágio avançado (pacientes diagnosticados nos estágios III e IV);
- Metástases: metastático e não metastático
- Tratamento: cirurgia (C), radioterapia (R), cirurgia + radioterapia (CR), cirurgia + quimioterapia (CQ), cirurgia + radioterapia + quimioterapia (CRQ)
- Metástase (regional e/ou à distância): sim/não;
- Condição Clínica: vivo sem doença (VSD), vivo com doença primária (VCDP), vivo com doença metastática (VCDM), óbito.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Análise da Expressão Gênica

#### 6.1.1 Descrição sócio-demográfica e clinicopatológica da amostra de CCEB utilizada para ensaio *qPCR*

A amostra utilizada para *qPCR* foi composta por 17 pacientes sendo 9(52,9%) classificados como tumores primários não metastáticos e 8(64,7%) classificados com tumores primários metastáticos. A maioria dos pacientes era do sexo feminino (58,8%), com idade média de 56,5 anos, variando entre 38 e 78 anos. Quanto aos fatores de risco, a maioria dos pacientes era fumante (n=11; 64,7%) e consumia uma média de 23 cigarros por dia. Também a maioria dos pacientes fazia o uso de bebida alcoólica (n=10; 58,8) e consumiu a uma média de 0,5 litros de bebida alcoólica por dia, principalmente cerveja e/ou pinga. Quanto as características clínicas da lesão, a maioria (64,7%) dos pacientes possuíam lesões menores ou iguais a 4 centímetros em seu maior diâmetro, sendo a língua a topografia mais afetada com 8(64,7%) casos, seguido de assoalho bucal com 5(29,4%) casos; região retromolar (n=2; 11,7%), gengiva (n=1; 5,8%) e mucosa jugal (n=1; 5,8%). A sintomatologia estava presente em 14 (82,3%) sendo a dor (n=12; 70,5%) o sintoma mais observado. Quanto ao estadiamento, a maioria dos pacientes (n=11; 64,7) foi diagnosticada em estágio inicial da doença sendo que apenas três pacientes (17,3%) foram a óbito. A Tabela 2 descreve as principais características clinicopatológicas dos 17 casos de CCEB incluídos no estudo prospectivamente, utilizados para o ensaio de *qPCR*.

TABELA 2 – Distribuição dos 17 pacientes com CCEB cujas amostras foram utilizadas em ensaio de *qPCR*, quanto aos dados sociodemográficos e clinicopatológicos

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	Nº DE PACIENTES (%)
Idade	< 60 anos	8(47,1)
	≥ 60 anos	9(52,9)
Sexo	Masculino	7(41,1)
	Feminino	10(58,8)
Tabagismo	Sim	11(64,7)
	Não	6(35,2)
Etilismo	Sim	10(58,8)
	Não	7(41,1)
	Sim	6(35,2)
História de câncer na família	Não	2(11,7)
	SI <sup>1</sup>	9(52,9)
Tamanho	≤4 cm	11(64,7)
	>4 cm	6(35,2)

<sup>1</sup>SI: sem informação; <sup>2</sup>VSD: vivo sem doença; <sup>3</sup>VCDP: vivo com doença primária; <sup>4</sup>VCDM: vivo com doença metastática.

Continua...

... Continuação da TABELA 2

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	Nº DE PACIENTES (%)
Localização	Língua	8(64,7)
	Assoalho bucal	5(29,4)
	Outros	4(23,5)
Sintomas	Sim	14 (82,3)
	Não	3(17,6)
Metástase Regional	Sim	8(64,7)
	Não	9(52,9)
Estadiamento	Inicial	11(64,7)
	Avançado	6(35,2)
Condição Clínica	VSD <sup>2</sup>	1(5,8)
	VCDP <sup>3</sup>	6(35,2)
	VCDM <sup>4</sup>	7(41,1)
	Óbito	3(17,6)

<sup>1</sup>SI: sem informação; <sup>2</sup>VSD: vivo sem doença; <sup>3</sup>VCDP: vivo com doença primária; <sup>4</sup>VCDM: vivo com doença metastática.

Fonte: dados da pesquisa.

### 6.1.2 Expressão gênica relativa entre os grupos CCEB e controle

Os dados referentes à avaliação quantitativa dos genes (expressão gênica funcional relativa) *GSK3 $\beta$* , *APC*, *CCTBN*, *c-MYC*, *CCND1* e *CDH1* do grupo controle e dos pacientes com CCEB estão distribuídos na Figura 6. No geral, a expressão relativa dos genes *GSK 3 $\beta$* , *c-MYC*, *CDH1* e *CCND1* foi maior no grupo CCEB do que no grupo controle. A expressão relativa do gene *APC* não diferiu entre os grupos, e a expressão do gene *CCTBN* foi maior no grupo controle que no CCEB. Contudo, uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada para *CCND1*, *CDH1* e *CCBTN*.

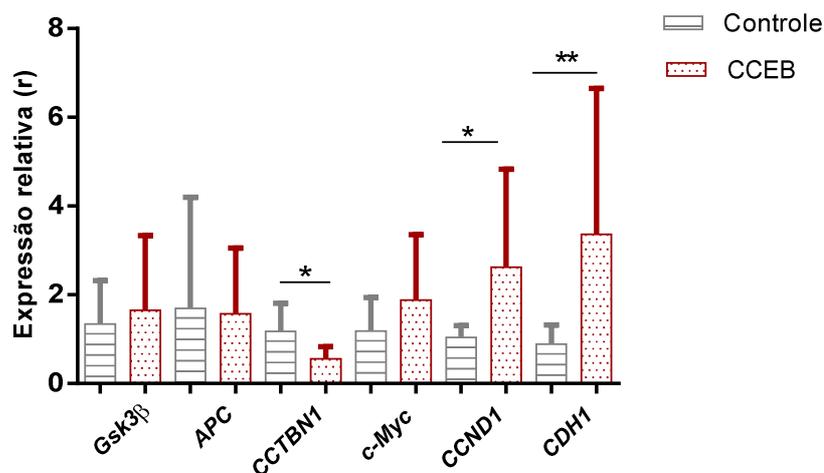


FIGURA 6 – Expressão relativa dos genes *GSK3 $\beta$* , *APC*, *CCTBN*, *c-Myc*, *CCND1* e *CDH1* nos grupos controle e CCEB. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  (Teste *U* de Mann-Whitney).

Fonte: dados da pesquisa — elaboração da Marília Ferreira Andrade

### 6.1.3 Expressão Gênica Relativa entre os grupos PNM, PM e controle:

Os dados referentes à avaliação quantitativa dos genes (expressão gênica funcional relativa) *GSK3β*, *APC*, *CCTBN*, *c-MYC*, *CCND1* e *CDH1* entre o grupo controle e o grupo de pacientes com CCEB PNM e PM podem ser observados na Figura 7.

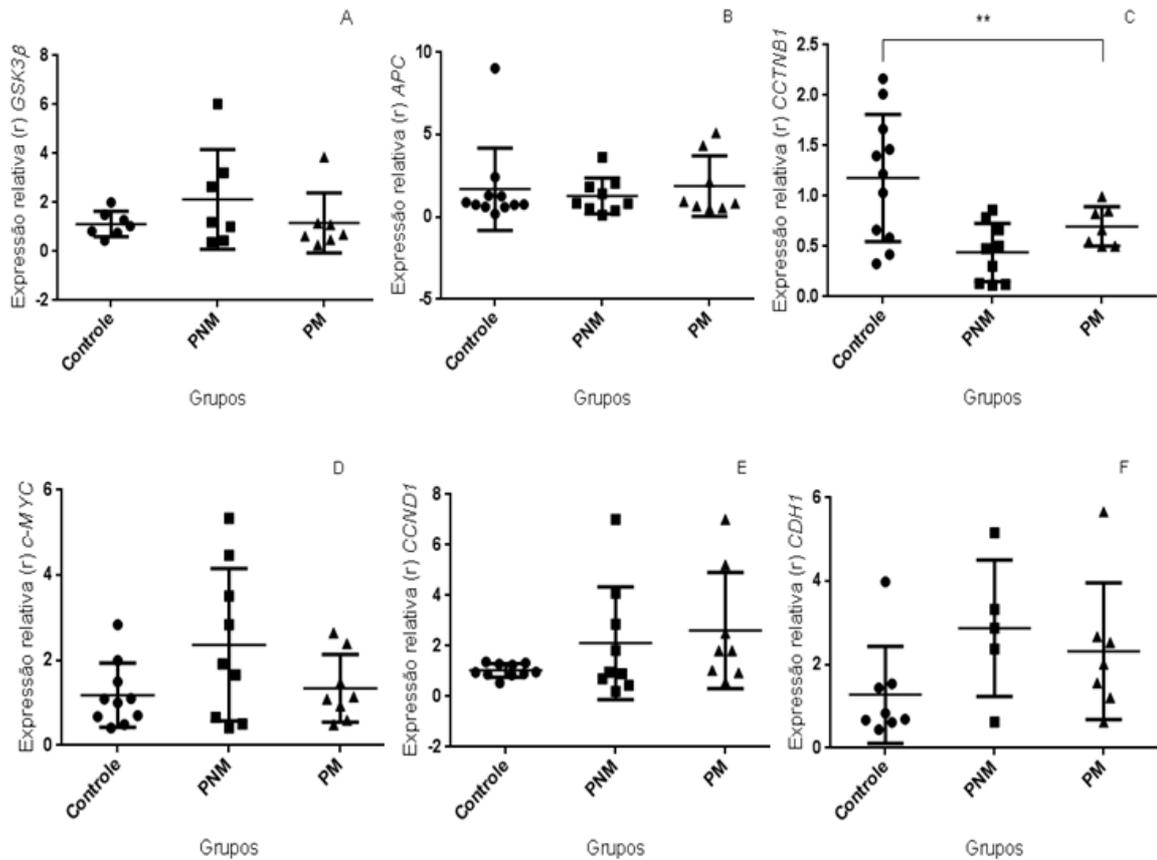


FIGURA 7 – Expressão relativa dos genes *GSK3β*, *APC*, *CCTBN*, *c-Myc*, *CCND1* e *CDH1* nos grupos controle e PNM e PM. Dados expressos como mediana  $\pm$  desvio padrão. Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn).

Fonte: dados da pesquisa — elaboração da Marília Ferreira Andrade

## 6.2 Análise da expressão proteica

### 6.2.1 Descrição sócio-demográfica e clinicopatológica da amostra de CCEB utilizada para ensaio imunohistoquímico

A Tabela 3 mostra as principais características clinicopatológicas dos 90 casos de CCEB incluídos neste estudo. A maioria era do sexo masculino (75,5%) com idade média de 60 anos, variando de 34 a 99 anos. Com relação à exposição aos dois

principais fatores de risco para o CCEB, a quase totalidade dos pacientes era de fumantes (93,3%) e etilistas/ex-etilistas (80%), com média de 25,6 cigarros/dia e 1,1 L/dia, respectivamente. Quase que a metade dos pacientes tinha história familiar de câncer. Sintomatologia foi observada em 65,5% deles, sendo dor (35,5%) e disfagia (31,9%) as mais frequentemente registradas. Outros sintomas registrados, mas em menor proporção, foram trismo, sangramento, xerostomia, ardência, disfonia e dispneia, totalizando 8,4% dos pacientes. Quanto ao aspecto clínico das lesões, 84,4% eram ulceradas, sendo 37 delas (41,1%) localizadas na língua, mostrando dimensão inferior a 4,0 cm no maior diâmetro (47,7%).

Sessenta e seis (73,2%) dos pacientes apresentavam tempo de evolução da doença (tempo transcorrido entre a percepção da lesão pelo paciente e a busca de atendimento) superior a três meses e 57(87,8%) deles já se encontravam em estágio avançado (estágio III e IV).

Detalhando um pouco mais, quanto ao estadiamento dos pacientes, 36 foram diagnosticados no estágio IV (40%), seguido pelo estágio III (n=26, 28,9%), estágio II (n=17, 18,9%) e estágio I (n=11; 12,2%). Metástases locorregionais foram observadas em 48 pacientes (53,3%), com apenas dois deles desenvolvendo metástases à distância. Quanto à gradação histológica dos casos com informações recuperadas, 38,8% dos tumores foi classificado como bem diferenciado, seguido de moderado/pobremente diferenciado (41,1%). Embora a maioria dos pacientes fosse diagnosticada com doença em estágio avançado, a metade deles não desenvolveu recidiva local (55,5%), sendo a mesma observada em apenas 19 (21,1%) casos. Destes 19 casos que tiveram recidiva local, 8 (42,1%) foram diagnosticados em estágio avançado e 11 (57,8%) em estágio inicial da doença.

Quanto ao tratamento empregado, a combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia (terapia trimodal) foi a mais empregada (n=31; 34,4%), seguido por radio e quimioterapia (n=21; 23%), e cirurgia associada à radioterapia (n=13; 14%). Quanto a radioterapia, a cobaltoterapia foi a mais utilizada (n=55, 61%), seguida por acelerador linear (n=12, 13,5%). Sobre a quimioterapia a droga mais utilizada foi a cisplatina.

Quanto à condição clínica dos pacientes ao final do estudo, 40% dos casos evoluíram para óbito e os demais ou se encontravam vivos sem doença (34,4%) ou com doença primária residual (n=19;21,1%) ou metástases (n=4;4,4%).

TABELA 3 – Distribuição dos 90 pacientes com CCEB cujas amostras foram utilizadas em ensaio imunohistoquímico, quanto aos dados sociodemográficos e clinicopatológicos:

VARIÁVEIS	CATEGORIAS	Nº DE PACIENTES (%)
Idade	< 60 anos	13(14,4)
	≥ 60 anos	77(85,5)
Sexo	Masculino	68(75,5)
	Feminino	22(24,4)
Tabagismo	Sim	81(93,3)
	Não	9(10,0)
Etilismo	Sim	72(80,0)
	Não	18(20,0)
História de câncer na família	Sim	40(44,4)
	Não	41(45,5)
	SI <sup>1</sup>	9(10,0)
Tamanho	≤4 cm	43(47,7)
	>4 cm	36(40,0)
	SI	11(12,2)
Localização	Língua	37(41,1)
	Assoalho bucal	23(25,5)
	Outros	30(33,3)
Evolução da doença	<3 meses	20(22,2)
	>3 e <6 meses	17(18,8)
	>6 meses	49(54,4)
	SI	4(4,4)
Sintomas	Sim	59(65,5)
	Não	26(28,8)
	SI	5(5,5)
Classificação Histológica	BD <sup>2</sup>	35(38,8)
	MD/PD <sup>3</sup>	37(41,1)
	SI	18(20,0)
Metástase Regional	Sim	48(53,3)
	Não	42(46,6)
Estadiamento	Inicial	28(31,1)
	Avançado	62(68,8)
Recidiva Local	Sim	19(21,1)
	Não	50(55,5)
	SI	21(23,3)
Tratamentos	C <sup>4</sup>	13(14,4)
	R <sup>5</sup>	10(11,1)
	CR <sup>6</sup>	13(14,4)
	QR <sup>7</sup>	21(23,3)
	CRQ <sup>8</sup>	31(34,4)
Condição Clínica	VSD <sup>9</sup>	31(34,4)
	VCDP <sup>10</sup>	19(21,1)
	VCDM <sup>11</sup>	4(4,4)
	Óbito	36(40,0)

SI<sup>1</sup>: sem informação; BD<sup>2</sup>: bem diferenciado; MD/PD<sup>3</sup>: moderadamente diferenciado/pobremente diferenciado; C<sup>4</sup>: cirurgia; R<sup>5</sup>:radioterapia; CR<sup>6</sup>: cirurgia+radioterapia; QR<sup>7</sup>: quimioterapia+radioterapia; CRQ<sup>8</sup>:cirurgia+radioterapia+quimioterapia; VSD<sup>9</sup>:vivo sem doença; VCDP<sup>10</sup>:vivo com doença primária;VCDM<sup>11</sup>: vivo com doença metastática.

Fonte: dados da pesquisa

O tempo de acompanhamento médio dos 90 pacientes foi de 24,5 meses, com mínimo de um mês e máximo de 128 meses. Porém, como os dados de acompanhamento seguiram uma distribuição não paramétrica, assumiu-se a mediana global de sobrevida de 53 meses para análise de sobrevida de acordo com as variáveis clinicopatológicas.

A Figura 8 apresenta os gráficos com as curvas de Kaplan Meier para o tempo de sobrevida global, e curvas de Kaplan Meier para o tempo de sobrevida segundo histórico de câncer familiar, tamanho da lesão, metástase regional, estágio da doença e tratamento cujos valores de  $p$  foram estatisticamente significantes após realização do teste *log-rank* de Cox-Mantel (FIG. 8).

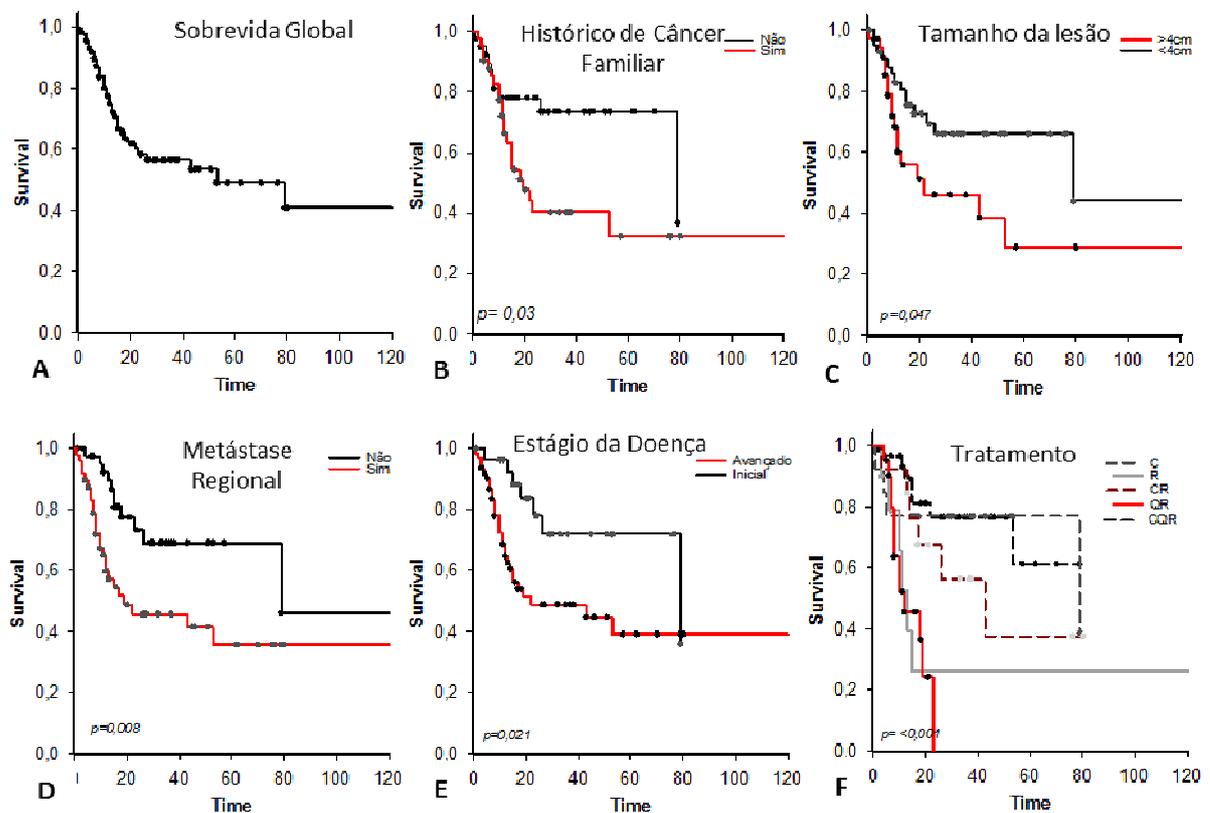


FIGURA 8 – Curvas de Kaplan-Meier para tempo de sobrevida global dos 90 pacientes com CCEB. Em A, tem-se a análise de sobrevida global. Em B, tem-se a análise de sobrevida quanto ao histórico de câncer familiar; em C quanto ao tamanho das lesões ( $\leq 4$  cm ou  $> 4$  cm); em D quanto a presença ou ausência de metástase regional; em E quanto ao estágio da doença (inicial ou avançado) dos pacientes; e em F, quanto ao tipo de tratamento realizado. Os resultados foram analisados pelo teste *log-rank* de Cox-Mantel.

Fonte: dados da pesquisa — elaboração da Marília Ferreira Andrade

### 6.2.2 Descrição do padrão de marcação para cada anticorpo estudado e análise de Quickscore

O número de amostras analisadas para cada anticorpo investigado variou e as razões disso foram desde ausência do *spot* no TMA como também ausência de tumor dentro do *spot*. No geral, a expressão imuno-histoquímica de todas as proteínas investigadas foi observada na membrana, no citoplasma e núcleo das células tumorais, o mesmo sendo observado no controle. Quanto à intensidade de marcação, ela variou de negativo a forte para todas as proteínas estudadas, especialmente no grupo experimental. No caso do grupo controle, a intensidade foi predominantemente fraca e envolveu principalmente as camadas basal, parabasal e espinhosa do epitélio escamoso estratificado oral. A Figura 9 corresponde às imagens das reações imuno-histoquímicas para as proteínas GSK3  $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC,  $\beta$ -catenina, c-Myc, ciclina D1 e E-caderina nos grupos controle, PNM e PM respectivamente.

Os seguintes achados semiquantitativos de imunoexpressão foram identificados para:

➤ **GSK3 $\beta$ :** No grupo controle observou-se uma ausência de marcação em membrana, marcação citoplasmática moderada e fraca marcação nuclear. No grupo CCEB, uma imunomarcação predominantemente citoplasmática, tendo sido avaliados 87 casos, sendo 41 casos do grupo PNM e 46 casos do grupo PM. Em ambos os grupos a marcação citoplasmática foi a mais prevalente e de maior intensidade, com mediana igual a 18 no grupo PNM e 12 no grupo PM. Houve ausência de marcação em membrana para GSK3 $\beta$  no grupo CCEB. Marcação nuclear foi moderada no grupo PNM e fraca no grupo PM.

➤ **GSK3 $\beta$  fosforilada (pGSK3 $\beta$ -Ser9):** No grupo controle observou-se apenas marcação em citoplasma de intensidade fraca a moderada. Já no grupo CCEB, houve marcação citoplasmática fraca à moderada, tendo também sido avaliados 86 casos, 40 do grupo PNM e 46 do grupo PM, sendo a mediana para o grupo PNM foi igual a 10,8 e para o grupo PM 17,5. Também observou-se ausência de marcação em membrana e imunomarcação nuclear de baixa intensidade.

➤ **APC:** No grupo controle houve uma marcação extremamente fraca em citoplasma e ausência de marcação em membrana e núcleo. Já em CCEB, a marcação foi de intensidade moderada em citoplasma e núcleo com 86 casos analisados, sendo que a maioria

deles (95%) apresentava marcação citoplasmática, com mediana igual a 12 nos grupos PNM e PM.

➤ **β-catenina:** No grupo controle, houve predomínio de forte marcação em membrana e marcação moderada em citoplasma, com ausência de imunomarcação nuclear. Para o grupo CCEB, a marcação foi predominantemente citoplasmática em 80% das células analisadas; tendo sido avaliados 89 casos. Marcação nuclear de intensidade moderada a forte foi observada apenas em casos do grupo primário metastático (PM) com mediana igual a 7,2. A mediana para marcação em membrana foi de 6,0 no grupo PNM (menor que a mediana do grupo controle) e de 12,0 no grupo PM (igual ao grupo controle). Já a marcação citoplasmática teve mediana igual a 6,0 no grupo PNM e 12,0 no grupo PM.

➤ **c-Myc:** No grupo controle, houve ausência de marcação em membrana, fraca marcação citoplasmática e ausência de marcação nuclear. Em CCEB, a imunomarcação foi predominantemente citoplasmática e nuclear de intensidade moderada nos 81 casos analisados. Por se tratar de uma proteína própria do núcleo a análise de marcação nesse compartimento mostrou uma mediana de 0,0 para o grupo PNM e 8,0 no grupo PM.

➤ **Cilcina D1:** No grupo controle houve ausência de marcação em membrana e fraca positividade citoplasmática e nuclear. Para os 89 casos analisados, a marcação foi predominantemente nuclear, de intensidade moderada; no citoplasma, a marcação foi de fraca a moderada. Não houve marcação em membrana e a marcação nuclear foi predominante no grupo PM com mediana igual a 8,1.

➤ **E-caderina:** No grupo controle houve forte marcação em membrana com a mediana igual a 5,9 e ausência de marcação citoplasmática e nuclear. No grupo CCEB apenas 76 casos foram passíveis de análise. A membrana foi o principal compartimento celular marcado para essa proteína, com intensidade forte. Para o citoplasma, observamos marcação fraca a moderada. A mediana para marcação em membrana foi de 18,0 e 17,5 para os grupos PNM e PM respectivamente, não diferindo muito o padrão de imunomarcação em membrana para E-caderina em todo grupo CCEB.

A Tabela 4 descreve as medianas encontradas após análise de *Quickscore* do grupo controle e dos grupos PNM (primário não metastático-CCEB) e PM (primário metastático-CCEB).

TABELA 4 – Descrição dos valores de mediana de índices *Quickscore* de cada uma das proteínas estudadas encontrados na análise semiquantitativa dos ensaios imuno-histoquímicos nos grupos controle, carcinomas de células escamosas, primários metastáticos e não metastáticos

GRUPO CONTROLE					
<i>Proteínas</i>	<i>N</i> <sup>1</sup>	<i>Membrana</i>	<i>Citoplasma</i>	<i>Núcleo</i>	<i>Total</i>
		m <sup>3</sup>	m	m	m
<b>GSK3β</b>	17	0	8	4	6
<b>pGSK3β-Ser9</b>	18	0	7,6	0	5,1
<b>APC</b>	18	0	0	0	2
<b>Beta-catenina</b>	17	12	7	0	2,3
<b>c-Myc</b>	18	0	4,8	0,9	1,9
<b>Ciclina D1</b>	16	0	0	0	3
<b>E-Caderina</b>	18	5,9	0	0	2
GRUPO CCEB <sup>2</sup> PRIMÁRIO NÃO METASTÁTICO					
<i>Proteínas</i>	<i>N</i>	<i>Membrana</i>	<i>Citoplasma</i>	<i>Núcleo</i>	<i>Total</i>
<b>GSK3β</b>	41	0	18	8	13
<b>pGSK3β-Ser9</b>	40	0	10,6	1,3	6,5
<b>APC</b>	40	0	12	18	10
<b>Beta-catenina</b>	41	6	6	0	4
<b>c-Myc</b>	39	0	8,6	0	2,8
<b>Ciclina D1</b>	41	0	1,8	4,2	2
<b>E-Caderina</b>	35	18	8,3	6,9	8
GRUPO CCEB <sup>2</sup> PRIMÁRIO METASTÁTICO					
<i>Proteínas</i>	<i>N</i>	<i>Membrana</i>	<i>Citoplasma</i>	<i>Núcleo</i>	<i>Total</i>
<b>GSK3β</b>	46	0	12	5,5	8,7
<b>pGSK3β-Ser9</b>	46	0	17,5	1,7	4
<b>APC</b>	46	0	12	12	8
<b>Beta-catenina</b>	48	12	12	7,2	10,4
<b>c-Myc</b>	42	0	12	8	6,6
<b>Ciclina D1</b>	48	0	2,7	8,1	3,6
<b>E-Caderina</b>	41	17,5	6	1,7	8,4

1 = número de casos avaliados; 2 = carcinoma de células escamosas bucais; 3 = mediana. Após ter sido realizado o cálculo de *Quickscore* de cada caso do grupo experimental (CCEB) para cada proteína estudada, observou-se que a distribuição destes não seguia os padrões de normalidade, tratando-se de dados não paramétricos. Sendo assim a mediana (m) passou a ser utilizada para realização de todas as análises estatísticas pertinentes.

Fonte: dados da pesquisa

A Figura 9 corresponde às imagens das reações imunohistoquímicas para as proteínas GSK3 β, pGSK3β-Ser9, APC, β-catenina, c-Myc, ciclina D1 e E-caderina nos grupos controle, PNM e PM respectivamente.

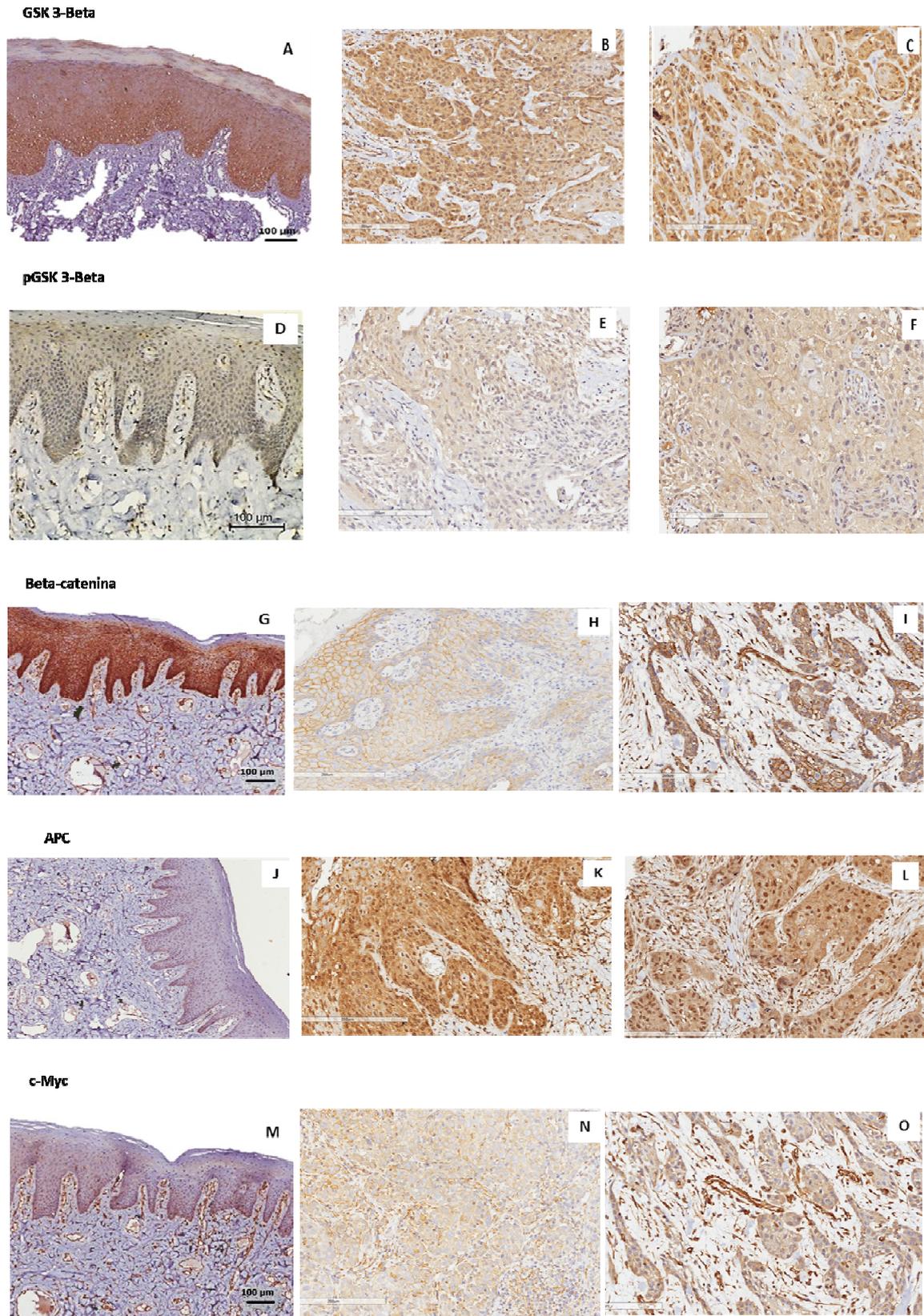


FIGURA 9a – Imagens das reações imunohistoquímicas para as proteínas GSK3  $\beta$  (A: grupo controle; B: grupo PNM; C: grupo PM), pGSK3 $\beta$ -Ser9(D: grupo controle; E: grupo PNM; F: grupo PM),  $\beta$ -catenina (G: grupo controle; H: grupo PNM; I: grupo PM), APC (J: grupo controle; K: grupo PNM; L: grupo PM), c-Myc (M: grupo controle; N: grupo PNM; O: grupo PM) [Continua na Fig. 9b].

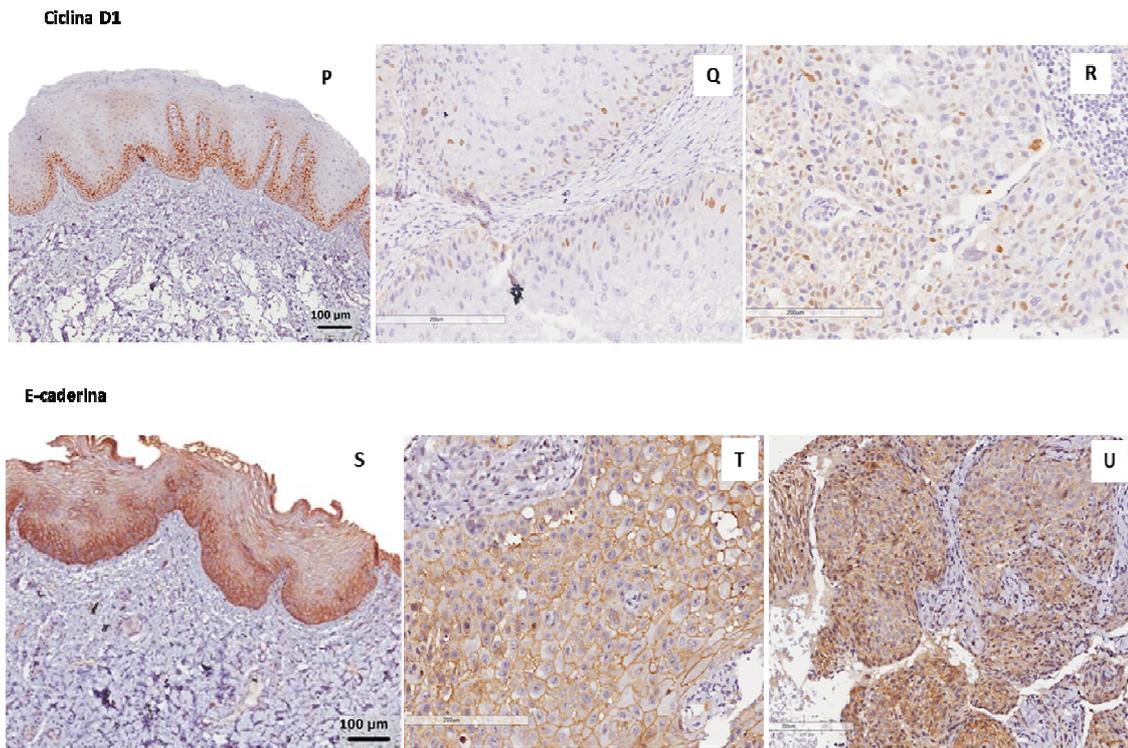


FIGURA 9b – [Continuação da Fig. 9a] Imagens das reações imunohistoquímicas para as proteínas ciclina D1 (P: grupo controle; Q: grupo PNM; R: grupo PM) e E-caderina (S: grupo controle; T: grupo PNM; U: grupo PM) nos grupos controle, PNM e PM respectivamente.

Fonte: dados da pesquisa — fotógrafo: Marília Ferreira Andrade.

### 6.2.3 Expressão das proteínas da via *Wnt-β-catenina*:

Na Figura 10 estão demonstrados os dados da avaliação semiquantitativa das proteínas estudadas: GSK3  $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC,  $\beta$ -catenina, c-Myc, ciclina D1 e E-caderina. Estes dados representam o dado médio do que foi avaliado nos três compartimentos celulares. No geral houve um aumento na expressão de quase todas as proteínas estudadas no grupo CCEB quando comparado ao grupo controle, sendo este aumento estatisticamente significante para APC, c-Myc e E-caderina. Já para Ciclina D1, nota-se que o padrão de expressão entre os grupos praticamente não se alterou.

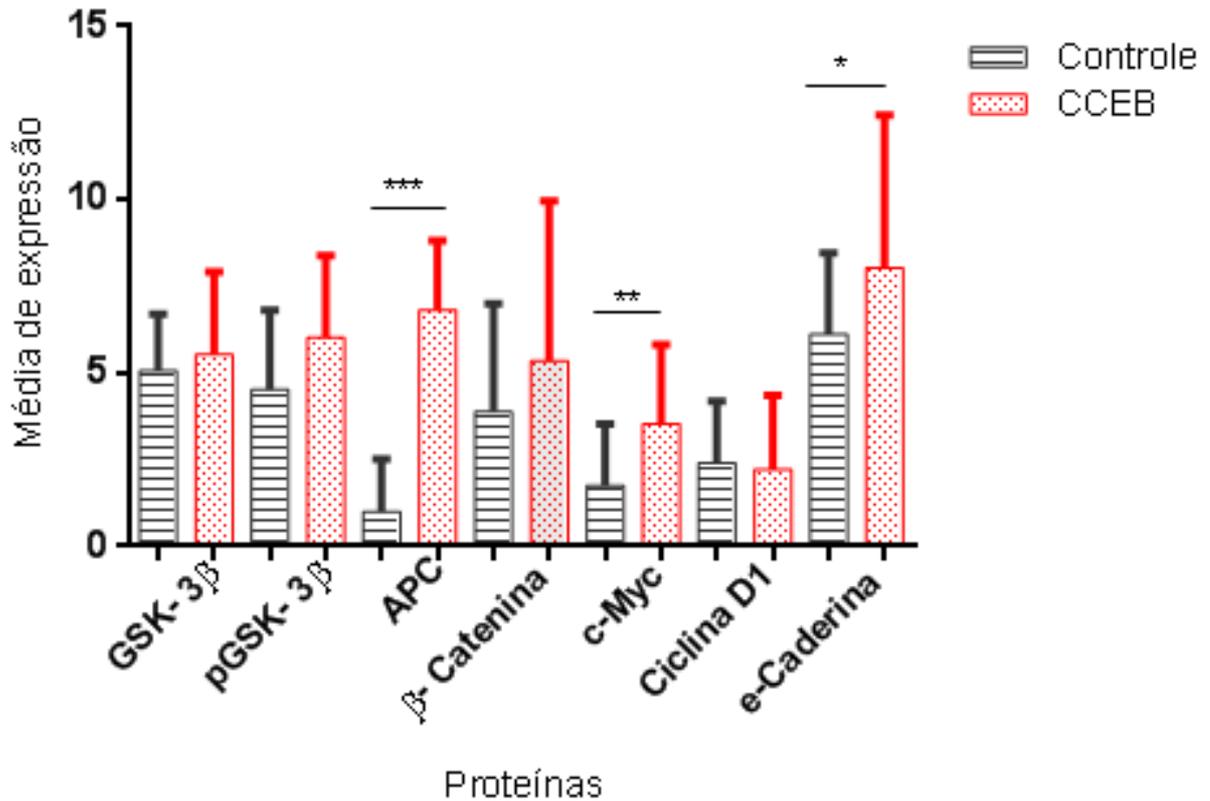


FIGURA 10 – Expressão imuno-histoquímica de cada proteína em relação aos grupos controles e o grupo CCEB. Dados expressos como média e intervalo de confiança de 95% para todas as proteínas. Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$  (Teste *U* de Mann-Whitney).

Fonte: dados da pesquisa — elaboração: Marília Ferreira Andrade

A Figura 11 mostra a expressão imuno-histoquímica das proteínas estudadas em relação aos grupos controle, PNM e PM. Houve diferença estatisticamente significativa para APC (entre os grupos controle e PNM, e grupos controle e PM, onde  $p < 0,0001$ ), para c-Myc (também entre os grupos controle e PNM, e grupos controle e PM onde  $p < 0,05$ ) e para e-Caderina apenas entre os grupos controle e PM com  $p < 0,05$  (FIG. 11).

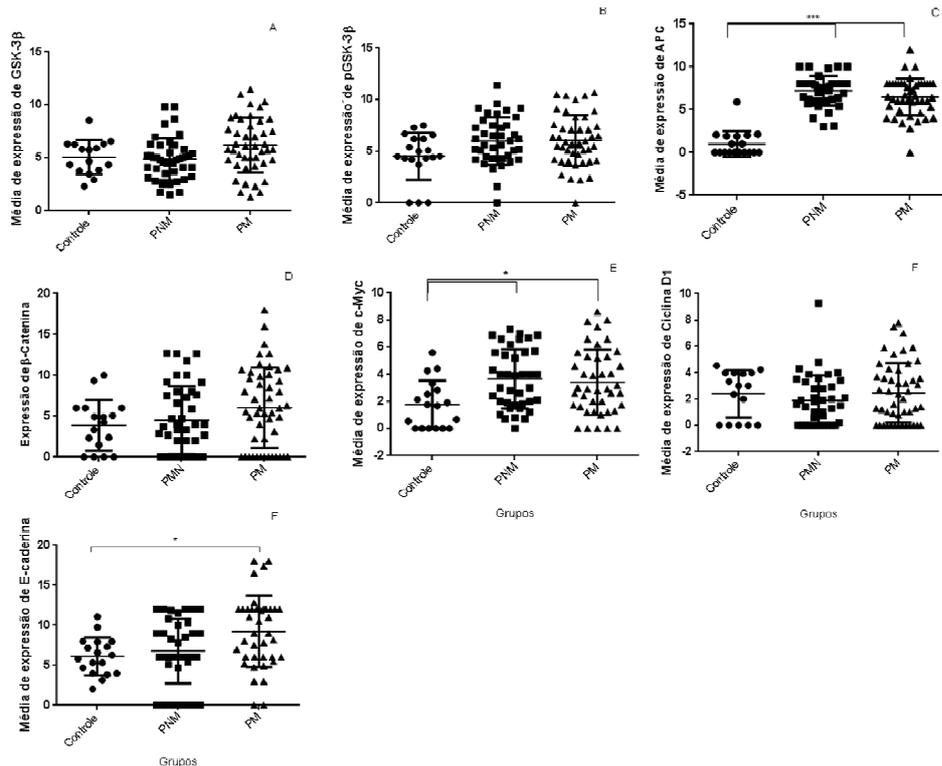


FIGURA 11 – Expressão imuno-histoquímica das proteínas nos grupos controle, PNM e PM. Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos: \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,0001$ . De A-F, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Os dados são apresentados na forma de médias e intervalo de confiança de 95%.

Fonte: elaboração para a pesquisa.

#### 6.2.4 Expressão das proteínas em relação às variáveis clinicopatológicas:

Os parâmetros clinicopatológicos avaliados foram: sexo, idade, tabagismo etilismo, histórico familiar de câncer, localização, sintomatologia, tamanho do tumor, estágio, metástase e condição clínica. A Tabela 4 mostra o número de casos com alta expressão quanto à mediana do *Quickscore* encontrada no grupo controle para cada proteína nos vários parâmetros analisados. Foi aplicado o Teste Chi-quadrado ou teste exato de Fischer associando-se alta (expressão maior ou igual a mediana do grupo controle) e baixa expressão (expressão menor a mediana do grupo controle) com as variáveis clinicopatológicas dicotômicas. Houve diferença estatisticamente significativa para GSK3β ( $p=0,0017$ ) e β-catenina ( $p=0,0089$ ) quanto ao sexo. Para idade, apenas houve diferença entre pacientes jovens e idosos quanto a expressão de c-Myc ( $p<0,0001$ ). Também para expressão de c-myc houve diferença estatisticamente significativa quanto a localização das lesões ( $p=0,001$ ). Quanto à presença ou ausência de sintomas, houve diferença estatisticamente significativa para expressão de GSK3β ( $p=0,0077$ ), pGSK3β ( $p=0,001$ ), β-catenina ( $p=0,001$ ), ciclina D1 ( $p<0,0001$ ) e e-caderina ( $p=0,0057$ ); sendo a sintomatologia a variável que mais apresentou diferença estatisticamente significativa dentre a expressão das proteínas estudadas. Houve também diferença estatisticamente significativa entre tamanho e a expressão de β-catenina ( $p<0,0001$ ) (TAB. 5).

TABELA 5 – Expressão das proteínas da via Wnt- $\beta$ -catenina, GSK3  $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9, APC,  $\beta$ -catenina, c-Myc, ciclina D1 e E-caderina e sua relação com as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas dos 90 pacientes com CCEB

X	GSK-3BETA		pGSK-3BETA		BETA-CATENINA		APC		c-MYC		CICLINA D1		e-CADERINA	
<i>Variáveis</i>	N <sup>1*</sup>		P		P		P		P		P		P	
<b>Sexo</b>														
Masculino	68	27		35		50	68	41	22	45				
Feminino	22	2	0,0017	16	NS	9	0,0089	22	NS	11	NS	7	NS	
<b>Idade</b>														
>60	13	5		7		9	43	10	4	9				
<60	77	25	NS	42	NS	45	NS	47	NS	43	<0,0001	25	NS	
<b>Tabagismo</b>														
Sim	81	27		43		55	81	48	29	61				
Não	9	3	NS	6	NS	4	NS	7	NS	4	NS	0	NS	
<b>Etilismo</b>														
Sim	72	26		39		50	71	42	25	50				
Não	18	4	NS	10	NS	9	NS	16	NS	11	NS	4	NS	
<b>HF Câncer<sup>4*</sup></b>														
Sim	41	16		20		24	41	23	12	27				
Não	40	12	NS	25	NS	29	NS	40	NS	27	NS	15	NS	
<b>Localização</b>														
Língua + Assoalho	60	22		33		38	60	34	20	55				
Outra	30	8	NS	18	NS	19	NS	30	NS	21	0,001	8	NS	
<b>Sintomatologia</b>														
Presente	59	20		32		37	75	32	16	43				
Ausente	26	9	0,0077	11	0,001	11	0,001	11	NS	9	NS	11	<0,0001	
<b>Tamanho</b>														
< 4cm	43	11		22		34	39	27	14	31				
> 4cm	36	14	NS	21	NS	16	<0,0001	37	NS	22	NS	13	NS	
<b>Estágio</b>														
Inicial	28	9		15		21	27	17	10	18				
Avançado	62	20	NS	36	NS	35	NS	61	NS	37	NS	19	NS	
<b>Metástase Regional</b>														
N <sup>+2*</sup>	48	19		28		32	48	26	17	37				
N <sup>-3*</sup>	42	10	NS	24	NS	28	NS	42	NS	30	NS	11	NS	
<b>Condição Clínica</b>														
Vivo	54	14		29		31	53	32	17	37				
Óbito	36	15	NS	21	NS	21	NS	37	NS	18	NS	10	NS	

1- valor de p (teste Chi-quadrado ou teste exato de Fischer); 2 - presença de metástase regional; 3 - ausência de metástase regional; 4- história familiar de câncer.  
Fonte: dados da pesquisa

### 6.2.5 Análise da expressão proteica por compartimento celular em relação ao grau de diferenciação do tumor

Para esta avaliação, considerou-se as observações das proteínas naqueles compartimentos em que estão associadas a uma função específica na via. Assim sendo considerou-se a expressão de GSK 3 $\beta$ , pGSK3 $\beta$ -Ser9 e APC em citoplasma;  $\beta$ -catenina em citoplasma e núcleo; c-Myc e Ciclina D1 em núcleo e E-caderina em membrana. Estes dados foram analisados em função dos diferentes graus histológicos de diferenciação tumoral, nos tumores PM e PNM. Assumiu-se como positivo aqueles casos onde o *Quickscore* do grupo tumoral foi maior que a mediana do *Quickscore* para aquele compartimento no grupo controle e negativo aqueles casos que não tiveram expressão ou que a expressão foi menor que a mediana do *Quickscore* para aquele compartimento no grupo controle. Como opção de análise, associamos os grupos moderadamente e pobremente diferenciados.

A Tabela 5 descreve o que foi encontrado na análise da expressão proteica por compartimento celular.

TABELA 6 – Análise da expressão proteica de acordo o compartimento celular de expressão de cada uma das proteínas estudadas segundo o grau de diferenciação dos 90 casos de CCEB

PROTEÍNA	MEMBRANA			
	Grau de diferenciação		p <sup>1</sup>	
<b>E-caderina</b>	BD <sup>2</sup>	MD/PD <sup>3</sup>		
Alta expressão	25	28	NS <sup>4</sup>	
Baixa expressão	4	4		
<b>Proteína</b>	<b>Citoplasma</b>			
		Grau de diferenciação	p	
<b>GSK 3<math>\beta</math></b>		BD	MD/PD	
Alta expressão		26	26	NS
Baixa expressão		8	6	
<b>pGSK 3<math>\beta</math></b>		BD	MD/PD	
Alta expressão		29	23	NS
Baixa expressão		5	11	
<b>APC</b>		BD	MD/PD	
Alta expressão		31	31	NS
Baixa expressão		4	2	
<b><math>\beta</math>-Catenina</b>		BD	MD/PD	
Alta expressão		23	25	NS
Baixa expressão		9	12	

1 - valor de p (Teste Chi-quadrado); BD<sup>2</sup>: bem diferenciado; MD/PD<sup>3</sup>: moderadamente diferenciado/pobremente diferenciado.

Continua...

Continuação da Tabela 5

PROTEÍNA		MEMBRANA		$p^1$
		<i>Grau de diferenciação</i>		
<b>Proteína</b>	<b>Núcleo</b>	<i>Grau de diferenciação</i>		<b>p</b>
		<b>BD</b>	<b>MD/PD</b>	
<b>c-Myc</b>	Alta expressão	16	19	NS
	Baixa expressão	15	16	
<b>Ciclina D1</b>	Alta expressão	25	21	NS
	Baixa expressão	10	14	
<b><math>\beta</math>- Catenina</b>	Alta expressão	6	12	p=0,0254
	Baixa expressão	29	15	

1 - valor de p (Teste Chi-quadrado); BD<sup>2</sup>: bem diferenciado; MD/PD<sup>3</sup>: moderadamente diferenciado/pobrememente diferenciado.

Fonte: dados da pesquisa

Houve diferença estatisticamente significativa apenas na comparação entre expressão de  $\beta$ -catenina em núcleo e grau de diferenciação, onde houve uma maioria de casos negativos para  $\beta$ -catenina nuclear dentre os tumores bem diferenciados.

Em 10 casos (um pertencente ao grupo PNM e nove pertencentes ao grupo PM) a expressão das proteínas estava biologicamente de acordo com uma possível ativação da via Wnt, onde observou-se um aumento da expressão de GSK 3 $\beta$ , p GSK 3 $\beta$  e APC em citoplasma, um aumento de expressão de beta-catenina em citoplasma e núcleo, expressão de c-Myc e Ciclina D1 em núcleo e diminuição da expressão de E-caderina em membrana. Destes 10 casos, a maioria eram masculinos (9/90%), maiores de 60 anos (9/90%), tabagistas e etilistas (9/90%), com sintomatologia (8/80%) e tempo de evolução da lesão superior a 6 meses (7/70%), sendo a língua a topografia mais afetada (4/40%), diagnosticados em estágio avançado (8/80%), com lesões histologicamente classificadas como moderadamente/pobrememente diferenciadas, sendo que metade (5/50%) destes pacientes foram a óbito.

#### 6.2.6 Correlação geral entre as proteínas estudadas:

Foi realizado um estudo de correlação entre todas as proteínas estudadas a fim de perceber se há alterações de expressão entre elas de maneira direta. Houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão das proteínas beta-catenina e c-Myc; correlação esta que foi positiva, sendo quando há aumento da expressão de c-Myc há também aumento da expressão de beta-catenina; com valor de  $p \leq 0,0001$ . Houve também resultados

estatisticamente significantes para GSK3 $\beta$  e pGSK-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$  e E-caderina, pGSK-3 $\beta$  e E-caderina, APC e c-Myc e APC e Ciclina D1, todos representados na Figura 12.

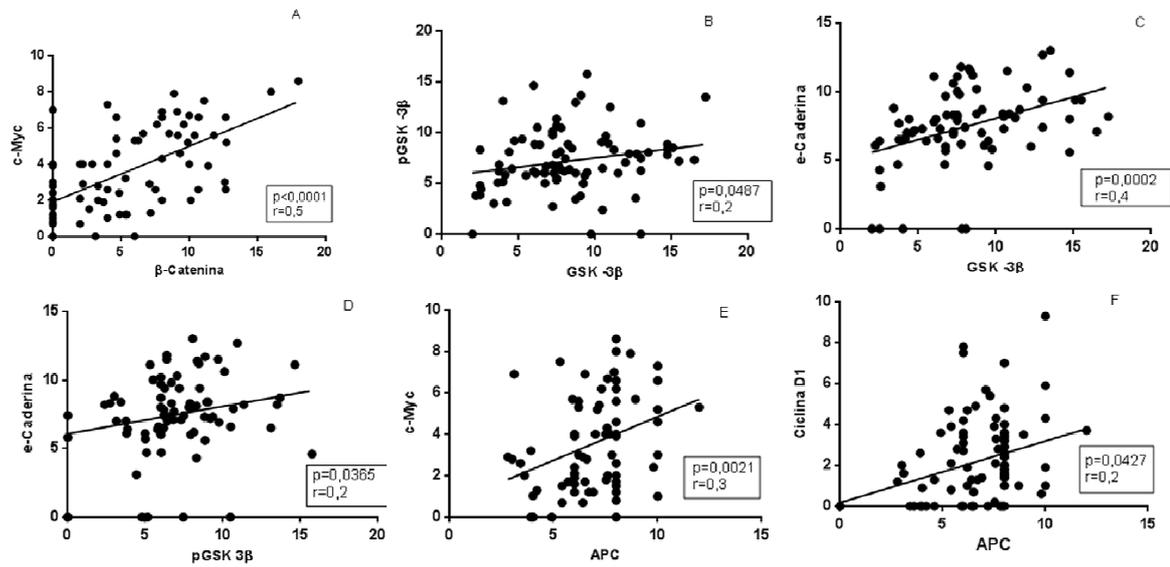


FIGURA 12 – Análise de correlação entre as proteínas estudadas que foram estatisticamente significativas (r - coeficiente de variação).

Fonte: elaboração para pesquisa

## 7 DISCUSSÃO

Este estudo teve como principal objetivo avaliar o papel da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina na progressão dos CCEB por meio da análise da expressão gênica e da semiquantificação proteica dos componentes efetores. Analisamos aqueles componentes pertencentes à via Wnt/ $\beta$ -catenina que se relacionam com os mecanismos intrínsecos de controle da proliferação celular em virtude da sua ativação e de alterações de mecanismos externos a via que resultem na maior disponibilidade de  $\beta$ -catenina. Além disso, observar se houve relação entre alterações na expressão proteica dos alvos estudados com fatores sociodemográficos e clinicopatológicos dentro de uma amostra de conveniência de CCEB também foram objetivo desse estudo.

Para tanto, procuramos ajustar o estudo utilizando uma amostra de conveniência em que houvesse dois grupos principais que se diferenciavam pela presença e ausência de metástases. Sendo assim, a amostra utilizada foi constituída predominantemente por pacientes masculinos, com idade igual ou superior a 60 anos, que eram tabagistas e etilistas crônicos. A predominância do paciente do sexo masculino, com a média etária situando-se entre 6ª e 7ª décadas de vida no CCEB está descrita na literatura (FELLER; LEMMER, 2012; WARNAKULASURIYA, 2009) como representativa dos pacientes mais acometidos pela doença. Esta é uma realidade também observada no Brasil, no qual a estimativa de novos casos de CCEB para homens no ano de 2016 é duas vezes maior que estimativa de diagnósticos de CCEB em mulheres, com cerca de 11.140 novos casos em homens e 4.350 em mulheres (INCA, 2016). A exposição aos fatores de risco (tabaco e álcool principalmente) também é um achado frequente na literatura quanto ao CCEB (DANTAS *et al.*, 2016). A exposição aos produtos do tabaco e do álcool pode influenciar diretamente nas taxas de mortalidade pela doença (DANTAS *et al.*, 2016), estando também relacionada ao pior prognóstico, traduzido pela presença de metástases e perda de diferenciação (MOYSES, 2013).

Quanto às características clínicas da lesão, os pacientes de nossa amostra possuíam lesões menores ou iguais a quatro centímetros em seu maior diâmetro, sendo a língua a principal topografia afetada, estando de acordo com achados descritos na literatura para mesma região brasileira (PIRES *et al.*, 2013). Alta incidência nas regiões anatômicas intrabuciais, especialmente língua e assoalho bucal, é frequentemente observada nos países ocidentais. Contrariamente, nos países orientais, especialmente asiáticos, há maior incidência

em mucosa alveolar e palato, traduzindo uma relação da lesão com outros geograficamente determinados, como noz areca, betel, e formas não convencionais de exposição ao tabaco fumado (JOHNSON *et al.*, 2005; WARNAKULASURIYA, 2009; TSENG *et al.*, 2011).

Em nossa amostra, a expressão da doença se deu por uma lesão ulcerada e sintomática em mais de 80% dos casos. A dor foi o sintoma mais frequentemente relatado pelos pacientes (35,3%). A presença de ulceração foi observada em 84,4% dos pacientes. Dor e ulcera são, classicamente, descritos como um dos principais sinais e sintomas comumente observados em pacientes com CCEB e, normalmente, estão associados com estágios avançados da doença (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; JOHNSON *et al.*, 2005), fato observado em 67,8% dos nossos pacientes.

Isto, de certa forma, pode estar associada ao atraso no diagnóstico da doença, fato ainda discutível na literatura. A maioria de nossos pacientes possuíam um histórico de evolução da lesão (tempo transcorrido entre a percepção da lesão pelo paciente e a busca de atendimento) superior à seis meses. Existem algumas explicações que podem justificar essa demora, e uma delas está ligada à percepção e/ou desconhecimento dos pacientes quanto à ocorrência de CCEB e seus sinais e sintomas iniciais, atrasando o diagnóstico e, por consequência, elevando o tempo de evolução (FARIA *et al.*, 2003; (BAGAN *et al.*, 2010). Um tempo de evolução longo também influenciará negativamente a sobrevida do paciente, estando os riscos socioeconômicos (que influenciam diretamente o tempo entre percepção da doença e seu diagnóstico e tratamento) como determinantes na mortalidade relacionada ao câncer oral (DANTAS *et al.*, 2016).

Quanto ao tratamento, a modalidade empregada para cada paciente depende de vários fatores, tais como condição clínica, o sítio afetado, tamanho clínico, extensão e invasão tumoral, mas de maneira geral a cirurgia é o tratamento de escolha. No presente estudo, a modalidade trimodal (cirurgia combinada com radioterapia e quimioterapia adjuvantes) foi o tratamento predominantemente empregado (34,4%), provavelmente porque muitos casos já estavam em estágios avançados da doença (FELLER; LEMMER, 2012; SHAH *et al.*, 2009). O tratamento do CCEB, caso o tumor seja ressecável, consiste em cirurgia do tumor primário ou radioterapia, principalmente nos estágios III e IV da doença. O tratamento combinado (ex: ressecção do tumor com no mínimo 1 cm de margem clinicamente saudável, seguido de radioterapia) é, no entanto, melhor sucedido. Radioterapia pós-cirúrgica combinada com quimioterapia aumenta as taxas de sobrevida global, mas está associada com um aumento substancial dos efeitos colaterais adversos, que incluem mucosite oral severa e osteorradiationecrose (COOPER *et al.*, 2004; ROGERS *et al.*, 2009; HOFFMANNNOVA *et al.*,

2010). Em nosso estudo, nenhum paciente foi tratado exclusivamente por quimioterapia e isso pode ser explicado pela natureza quimiorresistente das neoplasias epiteliais de cabeça e pescoço, incluindo o CCEB (GOLD *et al.*, 2014).

Bobdey *et al.* (2016) propôs um monograma (ferramenta prognóstica preditiva visual) para CCEB para prever com acurácia a sobrevida global dos indivíduos acometidos por essa malignidade. Os fatores que influenciaram a probabilidade de mortalidade foram: idade, comorbidades, status clínico linfonodal, estágio da doença, tamanho do tumor, grau de diferenciação e invasão perineural (BOBDEY *et al.*, 2016). Também Dantas *et al.* (2016) encontrou uma relação entre baixa sobrevida e pacientes diagnosticados em estágios avançados do CCEB. É consenso na literatura que os parâmetros estágio e metástase são fatores prognósticos associados com baixa sobrevida (TEICHGRAEBER; CLAIRMONT, 1984; CORTESINA; MARTONE, 2006; WARNAKULASURIYA, 2009). O tempo médio de acompanhamento dos pacientes do estudo foi de dois anos e a mediana de sobrevida global foi de 53 meses. Houve relação estatisticamente significativa entre presença de metástase linfonodal, lesões maiores que quatro centímetros em seu maior diâmetro e estágio avançado da doença com uma sobrevida global mais baixa, estando de acordo com a literatura.

Nossa amostra revelou 70% dos pacientes já em estágio avançado da doença e 53,3% com metástases regionais ao diagnóstico, o que refletiu em uma sobrevida ruim, com 40% dos casos tendo evoluído a óbito. Neste sentido, as características do diagnóstico do câncer no Brasil, dado por esta amostra de conveniência, aproxima-se daquilo que se vê em estudos de grandes amostras, nacionais e internacionais. A maior parte dos pacientes chega ao profissional com lesões avançadas (PIRES *et al.*, 2013; DANTAS *et al.*, 2016).

A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina está implicada na desregulação da proliferação, diferenciação, e no estabelecimento de um fenótipo de transição epitelial-mesenquimal em vários tipos de carcinomas, incluindo o de células escamosas bucais (LO MUZIO, 2001; URAGUCHI *et al.*, 2004). Evidências recentes aumentam o painel de genes da via Wnt/ $\beta$ -catenina relacionados com a carcinogênese bucal, tais como *c-MYC*, *CDH1* e *CCND1* envolvidos com a tumorigênese e proliferação celular (JOPE *et al.*, 2007; LUTZ *et al.*, 2002; URAGUCHI *et al.*, 2004; GHOSH *et al.*, 2016).

Não há na literatura estudos que abordem a expressão funcional relativa dos genes da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina em conjunto no CCEB como seu principal objetivo, sendo encontrados apenas relatos pontuais de investigações a cerca de alguns dos genes da via, em especial o *CTNNB1*. A tentativa de se estudar um maior número de elementos da via, em especial aqueles entre os quais se estabelece uma relação funcional na sua ativação, nos daria,

em tese, a oportunidade de verificar se a relação de expressão funcional está dentro de uma lógica prevista na sua ativação clássica, ou se, de outra forma, teríamos pistas que nos informassem sobre a necessidade de pesquisar outros mecanismos de regulação de sua expressão.

Em nosso estudo houve uma maior expressão do gene *CTNNB1* no grupo controle quando comparado ao grupo CCEB, sendo essa diferença também estatisticamente significativa quando comparamos os grupos controle e o grupo primário metastático. Uma explicação simplória para esse achado seria o fato de que se na ausência de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, o pool citosólico de  $\beta$ -catenina é continuamente degradado, como resultado da sua fosforilação pela proteína GSK3 $\beta$  e subsequente degradação através da via ubiquitina-proteossomo (DAKENG *et al.*, 2012); na presença de sinal Wnt/ $\beta$ -catenina a proteína  $\beta$ -catenina é acumulada no citoplasma e assim por compensação negativa não haveria a necessidade de maior expressão funcional gênica de *CTNNB1*. A literatura mostra a ausência de mutações gênicas *CTNNB1* em CCEB (YEH *et al.*, 2003; LO MUZIO *et al.*, 2005), apontando que outras alterações tais como modificações epigenéticas possam interferir na expressão proteica de  $\beta$ -catenina e sua consequente translocação para o núcleo.

Ghosh (2016) em um estudo onde demonstrou a influência de miRNA em modulação do tipo de transição epitelial-mioepitelial em CCEB através da análise do ganho de marcadores CSC (câncer stem cells) associados com indução da transição epitelial-mioepitelial em CCEB resistente à cisplatina comparados a CCEB primário. Observou-se que há uma amplificação gênica de *CTNNB1* no mRNA apenas em linhagens celulares resistentes à cisplatina em CCEB, sendo observado também o aumento da expressão proteica. Nas células de CCEB primário houve uma diminuição de *CTNNB1*, aumento da expressão de  $\beta$ -catenina acompanhada do aumento da expressão de E-caderina. O estudo conclui que em linhagens celulares de CCEB não resistentes (tumores primários) a transição epitelial-mioepitelial provavelmente ocorra de forma dependente de  $\beta$ -catenina e relacionada a E-caderina, porém nas células resistentes (metastáticos) outros mecanismos como os miRNA possam interferir nesse processo. Esse artigo nos mostra indícios de que outros fatores atuem na transformação do fenótipo invasivo de CCEB que não apenas o acúmulo de  $\beta$ -catenina e sua translocação para o núcleo. Comparando nossos resultados aos achados descritos acima, parece estar de acordo por tratarmos de tumores primários, onde a expressão de *CTNNB1*

Assim como observado na literatura, também observamos um aumento da expressão proteica de  $\beta$ -catenina no grupo CCEB como um todo, especialmente no grupo PM. Embora

nosso estudo não tenha utilizado uma estratégia de grupos pareados, a expressão gênica do grupo teste em relação ao controle foi diferente do que aí encontramos para a proteína. A expressão aberrante de  $\beta$ -catenina pode estar associada com inativação epigenética dos genes antagonistas i de Wnt, como sugerido por Pannone *et al.* (2010). Nesse estudo foi analisado, em uma amostra de CCEB primários e tecido bucal normal correspondente, o status de metilação de um painel de genes que estão envolvidos diretamente e indiretamente com a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, a fim de demonstrar a ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina na ausência de mutações em  $\beta$ -catenina e/ou APC durante a carcinogênese oral. O estudo sugere que a causa da alteração de localização de  $\beta$ -catenina pode ser devida à ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina, através de alterações epigenéticas dos genes inibidores da via, tais como, *SFRP*, *WIF-1* e *DKK-3* (PANNONE *et al.*, 2010).

Observando a localização celular de  $\beta$ -catenina, houve uma expressão predominantemente citoplasmática no grupo CCEB enquanto no grupo controle essa expressão foi predominantemente em membrana. Houve também forte expressão nuclear de  $\beta$ -catenina em casos do grupo PM. Quanto ao grau de diferenciação das lesões, houve diferença estatisticamente significativa apenas na comparação entre expressão de  $\beta$ -catenina em núcleo e grau de diferenciação, onde houve uma maioria de casos negativos para  $\beta$ -catenina nuclear dentre os tumores bem diferenciados. Esses achados concordam com o que há descrito na literatura (LO MUZIO *et al.*, 1999; LAXMIDEVI *et al.*, 2010; RAVINDRAN *et al.*, 2012; MAHOMED, 2006; SOARES *et al.*, 2015) Uragushi (2005), encontrou expressão citoplasmática e nuclear de  $\beta$ -catenina em 42 casos de CCEB invasivos. Este achado estava de acordo com Zhi-gang (2008) que também observou a imunoreatividade nuclear e citoplasmática de  $\beta$ -catenina principalmente em carcinomas pobremente diferenciados, reforçando o achado de que a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é crucial para predisposição do CCEB a um estado mais avançado de progressão e metástase.

Sendo assim, no nosso trabalho,  $\beta$ -catenina foi encontrada expressa de maneira heterogênea em CCEB em variadas intensidades e diferentes compartimentos celulares, mas foi especialmente detectada em membrana de células epiteliais normais. No entanto, essa expressão é um fenômeno complexo que dificulta o entendimento da célula tumoral, uma vez que expressão em ambos, membrana e citoplasma/núcleo, podem ocorrer simultaneamente.

Não é possível afirmar que a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina seja a única responsável por conferir à  $\beta$ -catenina uma condição de proteína oncogênica, através de sua estabilização em citoplasma e translocação ao núcleo. Uma vez que a  $\beta$ -catenina é crucial na

formação da adesão celular mediada por E-caderina, ela seria bi-funcional, agindo na via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e na adesão celular (NAGAFUCHI *et al.*, 1994; GOTTARDI *et al.*, 2001; URAGUSHI *et al.*, 2004). Também, os níveis celulares de  $\beta$ -catenina são constitutivamente regulados de maneira negativa por GSK-3 $\beta$ . Em um trabalho utilizando uma amostra de CCEB, Matsuo (2015), demonstrou evidências de que a via de sinalização PI3K-Akt esteja ativa em CCEB. A via de sinalização PI3K-Akt interfere na sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina justamente nos sítios de fosforilação de GSK3 $\beta$ , e portanto poderia interferir na regulação de  $\beta$ -catenina. . Outro componente essencial diretamente envolvido na estabilidade da  $\beta$ -catenina é a proteína APC. Mutações nas regiões amino-terminais de  $\beta$ -catenina, onde há sítios de ligação para fosforilação por serina pela GSK, pode estabilizar a  $\beta$ -catenina numa maneira independente de APC e de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina. Acúmulo de  $\beta$ -catenina também pode ocorrer através de mutações no sítio de ligação de APC que bloqueia a degradação de  $\beta$ -catenina (BEN-ZE'Ev *et al.*, 1998). Houve também um aumento na expressão funcional relativa de GSK3 $\beta$  em CCEB no nosso estudo, sendo maior no grupo PNM, enquanto que a expressão imuno-histoquímica da proteína não foi díspare entre os grupos. Considerando que a expressão do RNAm não está diretamente associado a presença da proteína na célula, faz-se necessário explorar a participação de alterações traducionais e pós-traducionais para explicar o cenário de produção proteica na amostra. Também não podemos esquecer que na análise de expressão gênica usamos tumores diferentes daqueles analisados por imunohistoquímica, e a variação intertumoral, que pode ser explicado pela diversidade de células tumorais presentes dentro do tumor e com perfis gênicos e epigênicos completamente distintos, pode ter contribuído para as diferenças observadas em nível gênico e proteico.

A expressão imunohistoquímica da contraparte inativa de GSK3 $\beta$ , a pGSK3 $\beta$ -Ser9, foi maior no grupo CCEB quando comparada ao grupo controle não diferindo muito entre os grupos PNM e PM em nosso estudo, sendo discretamente maior no grupo PM. Similar a isso, Mishra (2010) também mostrou um aumento da expressão de GSK3 $\beta$  e da sua forma inativa pGSK3 $\beta$ -Ser9 em CCEB quando comparado com o grupo controle. Em um estudo usando modelo de carcinogênese bucal em camundongos através da aplicação tópica de 4NQO, foi mostrado que a proteína pGSK3 $\beta$ -Ser9 estava significativamente associada com a progressão de displasia para carcinoma (MENDONÇA *et al.*, 2012). Isso em parte pode ser explicado pelo fato de que, em condições fisiológicas, a GSK3 $\beta$  ativa promove a degradação de ciclina D1, reduzindo a proliferação celular (TAKAHASHI-YANAGA; SASAGURI, 2008). Uma correlação positiva entre a expressão de pGSK3 $\beta$ -Ser9 e ciclina D1 e p53 tem sido observada

em amostras de CCEB (MISHRA; NAGINI; RANA, 2015). Sendo assim, parece que no caso da amostra investigada, a expressão de GSK3 $\beta$  e pGSK3 $\beta$ -Ser9 foi sempre maior no grupo CCEB, com pGSK3 $\beta$ -Ser9 destacando-se mais no grupo PM, indicando que nesse grupo predominou a expressão da forma inativa da GSK3 $\beta$ . Nesse sentido, é plausível supor que no grupo PM a ciclina D1 não deve estar sendo inibida, favorecendo uma progressão tumoral mais rápida e com aparecimento de clones de células tumorais mais adaptadas a desenvolverem metástases.

Seguindo esta linha de raciocínio, um aumento na expressão relativa de *CCND1* em CCEB também mostrou-se estatisticamente significativa em nosso estudo, porém a expressão imuno-histoquímica de ciclina D1 mostrou-se semelhante nos grupos controle e CCEB (sendo discretamente maior no grupo PM), sugerindo que a regulação de ciclina D1 via GSK3 $\beta$  de fato ocorreu em nosso estudo e até, pressupor que o aumento de expressão de pGSK3 $\beta$ -Ser9 possa ser associado a presença de metástase. Em contra-partida, GOTO *et al.* (2002) observaram um aumento da expressão imuno-histoquímica de ciclina D1 em carcinomas de língua em comparação ao tecido normal mas não detectou o aumento de expressão funcional relativa de *CCND1*, que ocorreu em apenas 2 dos 22 casos estudados (9,1%). No mesmo estudo, a expressão de GSK3 $\beta$  diminuiu em relação ao tecido normal. A intensidade de marcação de GSK3 $\beta$  mostrou uma associação inversa com ciclina D1. Os achados sugerem que a superexpressão de ciclina D1 resulta primariamente de sua estabilização devido redução de GSK3 $\beta$ , mas não da amplificação do gene da ciclina D1 em carcinomas de língua.

É consenso na literatura que alterações em expressão e mutações no gene *APC* são encontradas em hepatocarcinomas, carcinoma de células renais e nos carcinomas de pulmão (BRABENDER *et al.*, 2001; OHGAKI *et al.*, 2004; ODA *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2002; MIYAKI *et al.*, 1999; GERSTEIN *et al.*, 2002). Redução na expressão de *APC* acompanhadas de LOH para o gene *APC* foram relatadas em carcinomas de laringe e pele (GRAY *et al.*, 2011; PENG *et al.*, 2009). Porém nossos achados são opostos aos descritos na literatura para CCEB (UESUGI *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2005). Não foi encontrada uma alteração na expressão funcional relativa de *APC* entre os grupos estudados, no entanto sua expressão imuno-histoquímica mostrou-se significativamente aumentada no grupo CCEB, sendo relativamente semelhante entre os grupos PNM e PM. Iwai (2005) afirma que mutações que eventualmente estejam envolvidas com o gene *APC* levam a produção de uma proteína anômala, incapaz de ligar-se à  $\beta$ -catenina, interferindo no processo de fosforilação mediada pela GSK-3 $\beta$  e, conseqüentemente, sua degradação via proteassomo. Um explicação que se possa verificar em futuros estudos seria vinculada a presença de *APC* anômala que se

acumularia no citoplasma, proveniente da não formação do complexo multiproteico Axina/Conductina na presença de sinalização da via Wnt/ $\beta$ -catenina.

Houve um aumento da expressão de *c-MYC* no grupo PNM quando comparado ao grupo controle, embora não tenha sido estatisticamente significativa. O gene *c-MYC*, um proto-oncogene, tem sido identificado com sua expressão aumentada em lesões potencialmente malignas e em CCEB (SAAWARN *et al.*, 2012). Uragushi (2004), em seu estudo com linhagens celulares de CCEB, identificou uma amplificação de *MYC* no núcleo das linhagens celulares, apontando um aumento da expressão funcional relativa do mesmo nas células cancerosas. A expressão imuno-histoquímica de *c-Myc* também foi maior no grupo CCEB em comparação ao grupo controle, sendo este aumento estatisticamente significativo entre os grupos controle e PNM, controle e PM. Também em nosso estudo a correlação entre o aumento da expressão de  $\beta$ -catenina e o aumento de expressão de *c-Myc*, sendo esse estatisticamente significativo, sugerindo que em CCEB, à medida que a expressão de  $\beta$ -catenina cresce em decorrência de seu acúmulo em citoplasma e subsequente translocação para o núcleo, ocorre o aumento da expressão de *c-Myc*. Essa mesma relação foi observada no estudo de Ghosh (2016) principalmente nas células com perfil fenotípico mais agressivo.

Houve um aumento da expressão funcional relativa de *CDH1* e um aumento significativo na expressão de E-caderina em CCEB, principalmente no grupo PM. Este é um achado também intrigante pois, a literatura tem mostrado alterações gênicas e proteicas refletindo uma diminuição da expressão proteica em cânceres epiteliais (HANSFORD *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2015; PAREDES *et al.*, 2012; BREMNES *et al.*, 2002). Esta diminuição poderia estar associada a mutações disfuncionais. Sabe-se que este fenômeno tem sido relacionado com perda de adesão celular, importante no processo de disseminação tumoral (PAREDES *et al.*, 2012; STEMMLER, 2008; BEHRENS, 1991), indo de encontro ao que aqui foi identificado. Para CCEB, na literatura há descrito a diminuição da expressão de E-caderina em células tumorais, sendo essa diminuição maior naquelas células do front invasivo, apontando relação com recorrência e morte, porém não sendo confiável como marcador de metástase nodal (LIU *et al.*, 2009; MAHOMED, 2006; SOARES *et al.*, 2015; REN, 2016, THANGARAJ *et al.*, 2016).

Sabe-se que o fator de transcrição Snail tem um papel fundamental na transição epitélio-mesênquima por meio da supressão da expressão de E-caderina; por sua vez, a inibição de GSK3 $\beta$  causa o aumento da atividade de Snail e consequente regulação negativa de E-caderina. Assim, há a inibição da transcrição do gene *CDH1*, responsável por codificar a proteína E-caderina, proporcionando um aumento da invasão e metástase (JOPE *et al.*, 2007).

Em nosso trabalho houve o aumento da expressão de GSK (pGSK3 $\beta$ -Ser9 ) inativa em CCEB, mas não correspondente a regulação negativa de E-caderina..No entanto, mecanismos alternativos de controle da transição epitélio-mesênquima, independente da via Wnt/ $\beta$ -catenina e de E-caderina tem sido postulados na literatura. Sabe-se que EpCAM, uma glicoproteína transmembrana que funciona como uma molécula de adesão celular homofílica que interfere no contato célula-célula mediado por caderinas, é um potente transdutor de sinal que usa os componentes da via Wnt/ $\beta$ -catenina (no caso, a  $\beta$ -catenina em núcleo), para o desenvolvimento tumoral, renovação celular e proliferação (MAETZEL *et al.*, 2009). Também foi demonstrado que TGF- $\beta$  pode induzir a transição epitélio-mesênquima através de uma cascata de eventos em carcinoma de mama (ZHANG *et al.*, 2014). Em CCEB, as proteínas ESRP1 e ESRP2 (Epithelial Splicing Regulatory Protein 1 e 2) que regulam eventos de splicing associados a fenótipos epiteliais, estão reguladas negativamente no front invasivo, propiciando a transição epitélio-mesênquima e conferindo a essas células um fenótipo de motilidade independente de seu grau de diferenciação e organização de membrana celular (relacionado à E-caderina) (ISHII *et al.*, 2014). Como em nosso estudo as amostras teciduais para composição do TMA foram retiradas preferencialmente do front invasivo, pode ser que os eventos de splicing descritos acima tenham ocorrido, ou que qualquer um desses outros mecanismos citados possam ter interferido para verificação dessa expressão não esperada de E-caderina nos tumores, em especial naqueles metastáticos, tenha ocorrido.

Analisando os achados de expressão proteica e sua relação com fatores clinicopatológicos houve uma associação estatística entre  $\beta$ -catenina e sexo, tamanho e presença de sintomas; GSK3 $\beta$  e sexo; c-Myc entre idade e localização; ciclina D1 e presença de sintomas e E-caderina e presença de sintomas. Nenhuma associação entre expressão de  $\beta$ -catenina e idade e sexo dos pacientes, localização, tamanho e estágio do tumor, diferenciação histológica, padrão de invasão, metástase, recorrência e prognóstico foi reportada na literatura (ANDRADE *et al.*, 2013). Também não há na literatura relatos de associação a fatores clinicopatológicos para as demais proteínas, que nos aponte um papel da atuação da via Wnt/ $\beta$ -catenina como fator prognóstico determinante em CCEB.

Enfim, não é possível afirmar com os achados de nosso estudo que a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina esteja ativa em CCEB, embora o comportamento da expressão de  $\beta$ -catenina encontrado seja similar ao que ocorre na presença dessa sinalização. Outros estudos se fazem necessários para entender a progressão tumoral em CCEB independente de sinal Wnt/ $\beta$ -catenina.

## 8 CONCLUSÃO

1. Considerando as condições experimentais do presente estudo, percebeu-se que há alterações na expressão gênica da via Wnt/ $\beta$ -catenina e na transcrição de seus produtos proteicos na amostra estudada; estas alterações, contudo, não estão dentro de um padrão usualmente considerado como representativa de sua ativação na carcinogênese bucal, para a maioria dos casos analisados.
2. Da mesma forma, não encontramos evidências de que haja alteração da via Wnt- $\beta$ -catenina implicada no processo de progressão tumoral traduzido pelo aparecimento de metástases.

## 9 REFERÊNCIAS

- ACTIS, A. B.; LAMPE, P. D.; EYNARD, A. R. Cellular basis and clinical implications of biological markers in salivary tissues: their topological distribution in murine submandibular gland. **Oral Oncol**, v. 38, p. 441-449, jul. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(01\)00091-4](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(01)00091-4)
- ANASTAS, J. N.; MOON, R. T. WNT signaling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nature Reviews**, v. 13, p. 11-24, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrc3419>
- ANDRADE M. F.; LOYOLA A. A.; SILVA M. J. B.; MORAES, A. S.; MATSUO, F. S.; CARDOSO S. V.; SERVATO J. P.; LUZ, F. A. C.; FARIA, P.R. Role of beta- catenin in the context of Oral Squamous Cell Carcinoma and its Clinical Outcome. In: BRAUNFELD, A.; MIRSKY, G.R. (Org). **Beta Catenin**. New Science Publishers, p, 1-31, 2013.
- ANDRADE, V. P.; CUNHA, I. W.; SILVA, E. M.; AYALA, F.; SATO, Y.; FERREIRA, S. S.; NASCIMENTO, C. F.; SOARES, F. M. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Jornal Brasileiro de Medicina e Patologia Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 55-60, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000100011>
- BAGAN, J.; SARRION, G; JIMENEZ Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncology**, v. 46, n. 6, p. 414-417, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.03.009>
- BARBOSA DE PAULO L. F. Avaliação da expressão gênica e proteica da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina em amostras de Leucoplasia bucal e sua relação com fatores prognósticos com ênfase na transformação maligna. 2016. 99 fls. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica Integrada) — Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, 2016.
- BEHRENS, J.; WEIDNER K. M.; FRIXEN, U. H.; SCHIPPER, J. H.; SACHS, M.; ARAKAKI, N.; DAIKUHARA, Y.; BIRCHMEIER, W. The role of E-cadherin and scatter factor in tumor invasion and cell motility. **EXS**, v. 59, p. 109-26, 1991. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7494-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7494-6_8)
- BEHRENS, J; VON KRIES, J. P.; KUHL, M; BRUHN, L.; WEDLICH, D.; GROSSCHEDL, R.; BIRCHMEIER, W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. **Nature**, v. 382, p. 638–642, 1996. <https://doi.org/10.1038/382638a0>
- BOBDEY, S.; BALASUBRAMANIAM, G.; MISHRA, P. Nomogram prediction for survival of patients with oral cavity squamous cell carcinoma. **Head Neck**, 2016 . <https://doi.org/10.1002/hed.24507>
- BRABLETZ, T.; HERRMANN, K.; JUNG, A.; FALLER, G.; KIRCHNER, T.; Expression of nuclear beta-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas. **Am J Pathol**, v. 156, p. 865-870, Mar. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64955-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64955-3)

BRABENDER, J.; USADEL, H.; DANENBERG, K. D.; METZGER, R.; SCHNEIDER, P.M.; LORD, R.V.; WICKRAMASINGHE, K.; LUM, C.E.; PARK, J.; SALONGA, D.; SINGER, J.; SIDRANSKY, D.; HOLSCHER, A.H.; MELTZER, S.J.; DANENBERG, P.V.; Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival. **Oncogene**, v. 20, p. 3528-3532, Jun 14. 2001.

BREMNES R.M.; VEVE R.; HIRSCH F.R.; FRANKLIN W.A. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. **Lung Cancer**, v. 36, n. 2, p. 115-124, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0169-5002\(01\)00471-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5002(01)00471-8)

BRENER, S. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: a literature review of patient profile, clinical staging and proposed treatment. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 63-69, 2007.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

CHANG, K. W.; LIN, S. C.; MANGOLD, K. A.; JEAN, M. S.; YUAN, T. C.; LIN, S. N.; CHANG, C. S. Alterations of adenomatous polyposis Coli (APC) gene in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 29, p. 223-226, Jun. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0901-5027\(00\)80098-3](https://doi.org/10.1016/S0901-5027(00)80098-3)  
<https://doi.org/10.1034/j.1399-0020.2000.290314.x>

CHAU, Y.; HONGYO, T.; AOZASA, K.; CHAN, J. K.; Dedifferentiation of adenoid cystic carcinoma: report of a case implicating p53 gene mutation. **Hum Pathol**, v. 32, p. 1.403-1.407, Dec. 2001.

CHO, Y. J.; TSHERNIAK, A.; TAMAYO, P.; SANTAGATA, S.; LIGON, A.; GREULICH, H.; BERHOUKIM, R.; AMANI, V.; GOUMNEROVA, L.; EBERHART, C. G.; LAU, C. C.; OLSON, J. M.; GILBERTSON R. J.; GAJJAR, A.; DELATTRE, O.; KOOL, M.; LIGON, K.; MEYERSON, M.; MESIROV, J. P.; POMEROY, S. L. Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 11, p. 1.424–1.430, 2011.

COOPER, J. S.; PAJAK, T. F.; FORASTIERE, A. A.; JACOBS, J.; CAMPBELL, B. H.; SAXMAN, S. B.; KISH, J. A.; KIM, H. E.; CMELAK, A. J.; ROTMAN, M.; MACHTAY, M.; ENSLEY, J. F.; CHAO, K. S.; SCHULTZ C. J.; LEE, N.; FU, K. K. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. **New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 1.937–1.944, 2004.

CORTESINA, G.; MARTONE, T. Molecular metastases markers in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v. 26, n. 6, p. 317-325, 2006.

DAA, T.; KASHIMA, K.; KAKU, N.; SUZUKI, M.; YOKOYAMA, S.; Mutations in components of the Wnt signaling pathway in adenoid cystic carcinoma. **Mod Pathol**, v. 17, p. 1.475-1.482, Dec. 2004.

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

<https://doi.org/10.1002/jcb.23326>

DANTAS, T. S.; DE BARROS SILVA, P. G.; SOUSA, E. F.; DA CUNHA, M. D. O. P.; AGUIAR, A. S.; COSTA, F. W.; MOTA, M. R.; ALVES, A. P.; SOUSA, F. B. Influence of Educational Level, Stage, and Histological Type on Survival of Oral Cancer in a Brazilian Population: A Retrospective Study of 10 Years Observation. **Medicine**, v. 95, n. 3, p. 2.310-2.314, 2016.

DADRAS, S. S.; LANGE-ASSCHENFELDT, B.; VELASCO, P.; NGUYEN, L.; VORA, A. *et al.* Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. **Mod Pathol**, v. 18, p. 1.232-1.242, 2005.

DE LA COSTE, A.; ROMAGNOLO, B.; BILLUART, P.; RENARD, C. A.; BUENDIA, M. A.; SOUBRANE O.; FABRE, M.; CHELLY, J.; BELDJORD, C.; KAHN, A.; PERRET, C. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, p. 8.847–8.851, 1998.

DOBLE, B. W.; WOODGETT, J. R. Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial-mesenchymal transitions. **Cells Tissues Organs**, v. 185, n. 3, p. 73–84, 2007.

<https://doi.org/10.1159/000101306>

DURAZZO, M. D.; ARAUJO, C. E.; BRANDÃO NETO, J. S.; POTENZA, A. S.; COSTA, P.; TAKEDA, F.; BIANCHI, C.; TAVARES, M. R.; SILVA FILHO, G. B.; FERRAZ, A. R. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. **Clinics**, Sao Paulo, v. 60, n. 4, p. 293-298, 2005.

<https://doi.org/10.1590/S1807-59322005000400006>

FARAGO, M.; DOMINGUEZ, I.; LANDESMAN-BOLLAG, E.; XU, X.; ROSNER, A.; CARDIFF, R. D.; SELDIN, D. C.; Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3 $\beta$  promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis. **Cancer Res**, v. 65, p. 5.792-5.801, Jul. 2005.

FARIA, P. R.; CARDOSO, S. V.; DE, A. N. S.; SILVA, S. J.; LOYOLA, A. M. Clinical presentation of patients with oral squamous cell carcinoma when first seen by dentists or physicians in a teaching hospital in Brazil. **Clin Oral Investig**, v. 7, p. 46-51, Mar. 2003.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods

and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>

FELLER, L.; LEMMER, J. Oral squamous cell carcinoma: epidemiology, clinical presentation and treatment. **Journal of Cancer Therapy**, v. 3, n. 4, p. 263-268, 2012. <https://doi.org/10.4236/jct.2012.34037>

FRANCHI, A.; GALLO, O.; MASSI, D.; BARONI, G.; SANTUCCI, M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma :a morphometric study with clinical correlations. **Cancer**, v. 101, p. 973-978, 2004. <https://doi.org/10.1002/cncr.20454>

GAO, S.; EIBERG, H.; KROGDAHL, A.; LIU, C. J.; SORENSEN, J. A. Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v. 34, p. 116-119, Feb. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2004.00275.x>

GENDEN, E. M.; FERLITO, A.; SILVER, C. E *et al.* Contemporary management of the oral cavity. **European Archives of Otorhinolaryngol**, v. 267, n. 7, p. 1.001-1.017, 2010.

GERSTEIN, A. V.; ALMEIDA, T. A.; ZHAO, G.; CHESS, E.; SHIH, L. M.; BUHLER, K.; PIENTA, K.; RUBIN, M. A.; VESSELA, R.; PAPADOPOULOS, N. APC/CTNNB1 ( $\beta$ -catenin) pathway alterations in human prostate cancers. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 34, p. 9-16, 2002. <https://doi.org/10.1002/gcc.10037>

GILES, R. H.; VANES, J. H.; CLEVERS, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*, v. 5, n. 1, p. 1-24. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(03\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(03)00005-2)

GILTANE, J. M.; RIMM, D. L. Technology insight: identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 1, n. 2, p. 104-111, 2004. <https://doi.org/10.1038/ncponc0046>

GOMBOS, Z.; XU, X.; CHU, C. S.; ZHANG, P. J.; ACS, G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Clin Cancer Res.**, v. 11, p. 8.364-8.371, 2005.

GOTO, H.; KAWANO, K.; KOBAYASHI, I.; SAKAI, H.; YANAGISAWA, S.; Expression of cyclin D1 and GSK-3 $\beta$  and their predictive value of prognosis in squamous cell carcinomas of the tongue. **Oral Oncol**, v. 38, p. 549-556, Sep. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(01\)00121-X](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(01)00121-X)

GHOSH, R. D.; GHUWALEWALA, S.; DAS, P.; MANDLOI, S.; ALAM, S.K.; CHAKRABORTY, J.; SARKAR, S.; CHAKRABARTI, S.; PANDA, C.K.; ROYCHOUDHURY, S.. MicroRNA profiling of cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell lines enriched with cancer-stem-cell-like and epithelial-mesenchymal transition-type features. **Sci Rep.**, v. 5, n. 6, p. 239-332, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep23932>

GRANATO, D. C.; ZANETTI, M. R.; KAWAHARA, R.; YOKOO, S.; DOMINGUES, R. R. *et al.*; Integrated proteomics identified up-regulated focal adhesion-mediated proteins in human squamous cell carcinoma in an orthotopic murine model. **PLoS One**, v. 23, n. 9, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098208>

GRAY, S. E.; KAY, E. W.; LEADER, M.; MABRUK, M. Analysis of APC allelic imbalance/loss of heterozygosity and APC protein expression in cutaneous squamous cell carcinomas. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 8, p. 149-155, May-Jun. 2011.

HAN, J. P.; HONG, S. J.; KIM, H. K.; KIM, H. S.; LEE, Y. N.; LEE, T. H.; LEE, J. S. Expression of immunohistochemical markers according to histological type in patients with early gastric cancer. **Scand J Gastroenterol**, v. 51, n. 1, p. 60-66, 2016. <https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1065510>

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HANSFORD, S.; KAURAH, P.; LI-CHANG, H.; WOO, M.; SENZ, J.; PINHEIRO, H.; SCHRADER, K. A.; SCHAEFFER, D. F.; SHUMANSKY, K.; ZOGOPOULOS, G.; SANTOS, T.A.; CLARO, I.; CARVALHO, J.; NIELSEN, C.; PADILLA, S.; LUM, A.; TALHOUK, A.; BAKER-LANGE, K.; RICHARDSON, S.; LEWIS, I.; LINDOR, N. M.; PENNELL, E.; MACMILLAN, A.; FERNANDEZ, B.; KELLER, G.; LYNCH, H.; SHAH, S.P.; GUILFORD, P.; GALLINGER, S.; CORSO, G.; ROVIELLO, F.; CALDAS, C.; OLIVEIRA, C.; PHAROAH P.D.; HUNTSMAN, D. G. Hereditary Diffuse Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 1, p. 23-32, 2015. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2014.168>

HARRIS, T. M. D. U. P.; KAWACHI, N.; BELBIN, T. J.; WANG, Y.; SCHLECHT, N. F. *et al.* Proteomic analysis of oral cavity squamous cell carcinoma specimens identifies patient outcome-associated proteins. **Arch Pathol Lab Med**, v. 139, n. 4, p. 494-507, 2015. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0131-OA>

HENDERSON, B. R.; FAGOTTO, F. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. **EMBO Rep.**, v. 3, p. 834–839, 2002. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf181>

HOFFMANNOVÁ, J.; FOLTÁN, R.; VLK, M.; SIPOS, M.; HORKÁ, E.; PAVLÍKOVÁ G.; KUFA, R.; BULÍK, O.; SEDÝ, J. Hemimandibulectomy and therapeutic neck dissection with radiotherapy in the treatment of oral squamous cell carcinoma involving mandible: a critical review of treatment protocol in the years 1994-2004. **IntJ Oral Maxillofac Surg.**, v. 39, n. 6, p. 561-567, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2010.03.010>

HOWELL, G. M.; GRANDIS, J. R. Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **Head and Neck**, v. 27, n. 8, p. 710-717, 2005. <https://doi.org/10.1002/hed.20222>

HUANG R.; DING P.; YANG F. Clinicopathological significance and potential drug target of CDH1 in breast cancer: a meta-analysis and literature review. **Drug Des Devel Ther.**, v. 18, n. 9, p. 5.277-5.285, 2015.

HUANG, J. S.; CHIANG, C. P.; KOK, S. H.; KUO, Y. S.; KUO, M. Y. Loss of heterozygosity of APC and MCC genes in oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **J Oral Pathol Med**, v. 26, p. 322-326, Aug. 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1997.tb00223.x>

IKEDA, S.; KISHIDA, S.; YAMAMOTO, H.; MURAI, H.; KOYAMA, S.; KIKUCHI, A. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. **Embo J.**, v. 17, p. 1.371–1.384, 1998.

Instituto Nacional de Câncer – INCA. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer.** Rio de Janeiro; 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>>.

INOMATA M.; OCHIAI A.; AKIMOTO, S.; KITANO, S.; HIROHASHI, S. Alteration of beta-catenin expression in colonic epithelial cells of familial adenomatous polyposis patients. **Cancer Res.**, v. 56, p. 2.213–2.217, 1996.

ISHIDA, K.; ITO, S.; WADA, N.; DEGUCHI, H.; HATA, T.; HOSODA, M.; NOHNO, T. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. **Mol Cancer**, v. 9, p. 6-62, 2007. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-62>

ISHII H, SAITOH M, SAKAMOTO K, KONDO T, KATOH R, TANAKA S, MOTIZUKI M, MASUYAMA K, MIYAZAWA K. Epithelial splicing regulatory proteins 1 (ESRP1) and 2 (ESRP2) suppress cancer cell motility via different mechanisms. **J Biol Chem.**, v. 289, n. 40, p. 27.386-99, 2014.

IWAI, S.; KATAGIRI, W.; KONG, C.; AMEKAWA, S.; NAKAZAWA, M.; YURA, Y. Mutations of the APC, beta-catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 131, p. 773-782, Dec. 2005. <https://doi.org/10.1007/s00432-005-0027-y>

JOHNSON, N.; FRANCESCHI, S.; FERLAY, J.; RAMADAS, K.; SCHIMID, S.; MACDONALD, D. *et al.* Squamous cell carcinoma. In: BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHHART, P.; SIDRANKYS, D. (Ed.). **Pathology e Genetics**, WHO Classification Head and Neck Tumours. IARCPress, Lyon, v. 430, p. 163-175, 2005.

JOPE, R. S.; YUSKAITIS, C. J.; BEUREL, E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. **Neurochemical Research**, v. 32, n. 4-5, p. 577-595, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9128-5>

KLAUS A.; BIRCHMEIER W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 5, p. 387-98. 2008. <https://doi.org/10.1038/nrc2389>

KLEIN C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. **Nature Reviews**, v. 9, n. 4, p. 302-312, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrc2627>

- 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.**v. 59, p.269–273, 1999.
- KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O. P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, v. 4, n. 7, p. 844-847, 1998. <https://doi.org/10.1038/nm0798-844>
- KORINEK V.; BARKER N.; MORIN P.J.; VAN WICHEN D.; DE WEGER R.; KINZLER K.W.; VOGELSTEIN B.; CLEVERS H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. **Science** v.275, p. 1.784–1.787, 1997.
- KUDO, Y.; KITAJIMA, S.; OGAWA, I.; HIRAOKA, M.; SARGOLZAEI, S.; KEIKHAEI, M.R.; SATO, S.; MIYAUCHI, M.; TAKATA, T.; Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. **Clin Cancer Res**, v. 10, p. 5.455-5.463, Aug. 15. 2004.
- LAM, L.; LOGAN, R. M.; LUKE, C.; REES, G. L. Retrospective study of survival and treatment pattern in a cohort of patients with oral and oropharyngeal tongue cancers from 1987 to 2004. *Oral Oncology*,v. 43, n. 2, p. 150-158, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.12.030>
- LAXMIDEVI, L. B.; ANGADI, P. V.; PILLAI, R. K.; CHANDRESHEKAR, C. Aberrant beta-catenin expression in the histologic differentiation of oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: an immunohistochemical study. **J Oral Sci**, v. 52, p. 633-640, 2010. <https://doi.org/10.2334/josnusd.52.633>
- LEA, J.; BACHAR, G.; SAWKA, A. M.; LAKRA, D. C.; GILBERT, R. W.; IRISH, J. C.; BROWN, D. H.; GULLANE, P. J.; GOLDSTEIN, D. P. Metastases to level IIb in squamous cell carcinoma of the oral cavity: a systematic review and meta-analysis. **Head Neck**, v. 32, p. 184-190, 2010.
- LEE, J. H.; ABRAHAM, S. C.; KIM, H. S.; NAM, J. H.; CHOI, C.; LEE, M. C.; PARK, C. S.; JUHNG, S. W.; RASHID, A.; HAMITON, S. R.; WU, T. T. Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. **The American Journal of Pathology**, v. 161, p. 611-618, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64216-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64216-2)
- LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrc2982>
- LEIS, H.; SEGRELLES, C.; RUIZ, S.; SANTOS, M.; PARAMIO, J. M.; Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3beta during mouse skin tumorigenesis. **Mol Carcinog**, v. 35, p. 180-185, Dec. 2002.

- LI, V. S.; NG, S. S.; BOERSEMA, P. J.; LOW, T. Y.; KARTHAUS, W. R.; GERLACH, J. P.; MOHAMMED, S.; HECK, A. J.; MAURICE, M. M.; MAHMOUDI, T.; CLEVERS, H. Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact Axin1 complex. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1.245-1.256, 2012. <https://doi.org/10.1002/mc.10087>
- LIAO, C. T.; WANG, H. M.; CHANG, J. T.; NG, S. H.; HSUEH, C.; LEE, L. Y.; LIN, C. H.; CHEN, I. H.; HUANG, S. F.; YEN, T. C. Analysis of risk factors for distant metastases in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Cancer**, v. 110, p. 1.501-1.508, 2007.
- LIU, L. K.; JIANG, X. Y.; ZHOU, X. X.; WANG, D. M.; SONG, X. L.; JIANG, H. B. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. **Modern Pathology**, v. 23, n. 2, p. 213-224, 2010. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.160>
- LIU, W. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. **Oncogene**, v. 21, p. 4.863–4.871, 2002.
- LO MUZIO, L. A possible role for the WNT-1 pathway in oral carcinogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 12, p. 152-165, 2001 <https://doi.org/10.1177/10454411010120020501>
- LO MUZIO, L.; SATAIBANO, S.; PANNONE, G.; GRECO, M.; MIGNOGNA, M. D.; CERRATO, A.; TESTA, N.F.; DE ROSA, G. Beta and gamma-catenin expression in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 19, n. 5b, p. 3.817-3.826, 1999.
- LUO, J. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. **Cancer Lett**, v. 273, p. 194-200, Jan. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.045>
- LUSTIG, B.; BEHRENS, J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 129, n. 4, p. 199-221, 2003.
- MALI, S. B. RNA interference in oral cancer. **Oral Oncology**, v. 51, n. 1, p. 2-3, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.09.018>
- MEHROTRA, R.; YADAV, S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. **Indian Journal of Cancer**, v. 43, n. 2, p. 60-66, 2006. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.25886>
- MacDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Dev Cell**, v. 17, n. 1, p. 9-26, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- MAETZEL, D.; DENZEL, S.; MACK, B.; CANIS, M.; WENT, P.; BENK, M.; KIEU, C.; PAPIOR, P.; BAEUERLE, P. A.; MUNZ, M.; GIRES, O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 2, p. 162-71, 2009. <https://doi.org/10.1038/ncb1824>

MAHOMED, F.; ALTINI, M.; MEER, S. Altered E-cadherin/beta catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. **Oral Disease**, v. 13, n. 4, p. 386-392, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2006.01295.x>

MENDONÇA, D. F.; CHAMMAS, R.; LIU, F. T.; NONOGAKI, S.; CARDOSO, S. V.; LOYOLA, A. M.; DE FARIA, P. R. The inactive form of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is associated with the development of carcinomas in galectin-3 wild-type mice, but not in galectin-3-deficient mice. **International Journal Clinical Experimental Pathology**, v. 5, n. 6, p. 547-554, 2012.

MIYAKI, M.; LIJIMA, T.; KIMURA. Frequent mutation of  $\beta$ -catenin and APC gene in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 59, p. 4.506-4.509, 1999.

MATSUO, F. S. **Estudo da via de sinalização PI3K-Akt E GSK3 $\beta$  em carcinomas epidermóides metastáticos e não metastáticos de cavidade bucal**. 2015. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) — Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

MIRABELLI-PRIMDAHL, L.; GRYFE, R.; KIM, H.; MILLAR, A.; LUCERI, C.; DALE, D.; HOLOWATY, E.; BAPAT, B.; GALLINGER, S.; REDSTON, M. Beta catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. **Cancer Res.**, v. 59, p. 3.346–3.351, 1999.

MISHRA, R. Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. **Molecular Cancer**, v. 9, p. 144, 2010. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-144>

MISHRA, R.; NAGINI, S.; RANA, A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 1-20, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0300-x>

MOLENAAR, M.; VAN DE WETERING, M.; OOSTERWEGEL, M.; PETERSON-MADURO, J.; GODSAVE, S.; KORINEK, V.; ROOSE, J.; DESTREE, O.; CLEVERS, H. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. **Cell**, v. 86, p. 391–399, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80112-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80112-9)

MORIN, P. J.; SPARKS, A. B.; KORINEK, V.; BARKER, N.; CLEVERS, H.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Activation of beta-catenin-Tef signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. **Science**, v. 275, p. 1.787-1.790, 1997.

NI, Y. H.; DING, L.; HU, Q. G.; HUA, Z. C. Potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma: proteomics discovery and clinical validation. **Proteomics Clin Appl**, v. 9, p. 86-97, 2015. <https://doi.org/10.1002/prca.201400091>

NOGUTI, J.; MOURA, C. F. G.; JESUS, G. P. P.; SILVA, V. H. P.; HOSSAKA, T. A.; OSHIMA, C. T. F.; RIBEIRO, D. A. Metastasis from oral cancer: an overview. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 9, n. 5, p. 329-336, 2012.

ODA, H.; YASUO, I.; NAKATSURU, Y. Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. **Cancer Research**, v. 56, p. 3.320-3.323, 1996.

OHGAKI, H.; KROS, J.M.; OKAMOTO, Y.; GASPERS, A.; HUANG, H.; KURRER, M. O. APC mutations are infrequent but present in human lung cancer. **Cancer Lett**, v. 207, p. 197-203, Apr. 30. 2004.

OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 40, n. 3, p. 298-307, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2010.12.003>

PANNONE, G.; BUFO, P.; SANTORO, A.; FRANCO, R.; AQUINO, G.; LONGO, F.; BOTTI, G.; SERPICO, R.; CAFARELLI, B.; ABBRUZZESE, A.; CARAGLIA, M.; PAPAGERAKIS, S.; LO MUZIO, L. WNT pathway in oral cancer: Epigenetic inactivation of WNT-inhibitors. **Oncology Reports**, v. 24, p. 1.035-1.041, 2010

PAREDES, J.; FIGUEIREDO, J.; ALBERGARIA, A.; OLIVEIRA, P.; CARVALHO, J.; RIBEIRO, A. S.; CALDEIRA, J.; COSTA, A. M.; SIMÕES-CORREIA, J.; OLIVEIRA, M. J.; PINHEIRO, H.; PINHO, S. S.; MATEUS, R.; REIS, C. A.; LEITE, M.; FERNANDES, M. S.; SCHMITT, F.; CARNEIRO, F.; FIGUEIREDO, C.; OLIVEIRA, C.; SERUCA, R. Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1.826, n. 2, p. 297-311, 2012.

PARK, W. S.; OH, R. R.; PARK, J. Y.; KIM, P. J.; SHIN, M. S.; LEE, J. H.; KIM, H. S.; LEE, S. H.; KIM, S. Y.; PARK, Y. G.; AN, W. G.; JANG, J. J.; YOO, N. J.; LEE, J. Y. Nuclear localization of beta-catenin is an important prognostic factor in hepatoblastoma. **J Pathol.**, v. 193, p.483–490, 2001. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(2000\)9999:9999<::AID-PATH804>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH804>3.0.CO;2-R)

PECINA-SLAUS, N.; KLJAIC, M.; NIKUSEVA-MARTIC, T. Loss of heterozygosity of APC and CDH1 genes in laryngeal squamous cell carcinoma. **Pathol Res Pract**, v. 201, p. 557-563, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2005.07.001>

PENG, H.; ZHONG, X. Y.; LIU, K. P.; LI, S. M.; Expression and significance of adenomatous polyposis coli, beta-catenin, E-cadherin and cyclin D1 in esophageal squamous cell carcinoma assessed by tissue microarray. **Ai Zheng**, v. 28, p. 38-41, Jan. 2009.

PIRES, F. R.; RAMOS, A. B.; OLIVEIRA, J. B. C.; TAVARES, A. S.; LUZ, P. S. R. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single Oral Pathology service during an 8-year period. **Applied Oral Science**, v. 21, n. 5, p. 460–467, 2013. <https://doi.org/10.1590/1679-775720130317>

- PITIYAGE, G.; TILAKARATNE, W. M.; TAVASSOLI, M.; WARNAKULASURIYA, S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 38, n. 10, p. 737-752, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2009.00804.x>
- POLACHINI, G. M.; SOBRAL, L. M.; MERCANTE, A. M.; PAES-LEME, A. F.; XAVIER, F. C. Proteomic approaches identify members of cofilin pathway involved in oral tumorigenesis. **PLoS One**, v. 7, 2012.
- RAVINDRAN, G.; DEVARAJ, H. Aberrant expression of beta-catenin and its association with DeltaNp63, Notch-1, and clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma. **Clin Oral Investig**, v. 1, Sep. 2011.
- RASK, K.; NILSSON, A.; BRANNSTROM, M.; CARLSSON, P.; HELLBERG, P.; JANSON, P.O.; HEDIN, L.; SUNDFELDT, K.; Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: increased expression of beta-catenin and GSK3beta. **Br J Cancer**, v. 89, p. 1.298-1.304, Oct. 6. 2003.
- REN, X.; WANG, J.; LIN, X.; WANG, X. E-cadherin expression and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma: evidence from 19 published investigations. **Onco Targets Ther.**, v. 26, n. 9, p. 2.447-53, 2016.
- ROEPMAN, P.; WESSELS, L. F.; KETTELARIJ, N.; KEMMEREN, P.; MILES, A. J. *et al.* An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. **Nat Genet**, v. 37, p. 182–186, 2005. <https://doi.org/10.1038/ng1502>
- ROGERS, S. N.; BROWN, J. S.; WOOLGAR, J. A.; LOWE, D.; MAGENNIS, P.; SHAW, R.J.; SUTTON, D.; ERRINGTON D.; VAUGHAN D. Survival following primary surgery for oral cancer. **Oral Oncology**, v. 45, p. 201–211, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.05.008>
- RUBINFEL D. B.; ALBERT, I.; PORFIRI, E.; FIOL, C.; MUNEMITSU, S.; POLAKIS, P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. **Science**, v. 272, p. 1023–1026, 1996. <https://doi.org/10.1126/science.272.5264.1023>
- SATO, K.; OKAZAKI, Y.; TONOGLI, M.; TANAKA, Y.; YAMANE, G. Y. Expression of beta-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Oral Oncol**, v. 38, p. 772-778, Dec. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(02\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(02)00044-1)
- SHIMURA, T.; TAKENAKA, Y.; TSUTSUMI, S.; HOGAN, V.; KIKUCHI, A.; RAZ, A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. **Cancer Research**, v. 64, p. 6363–6367, 2004. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1816>
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1.101-1.102, 2008.
- SOARES, M. Q.; MENDONÇA, J. A.; MORAIS, M. O.; LELES, C. R.; BATISTA, A. C.; MENDONÇA, E. F. E cadherin,  $\beta$ -catenin, and  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 3\beta 1$  integrin expression in primary

oral squamous cell carcinoma and its regional metastasis. **Histol Histopathol**, V. 30, n. 10, p. 1.213–1.222, 2015.

SOBIN, L. H.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. **TNM Classification of Malignant Tumours**. International Union Against Cancer (UICC). 7<sup>th</sup> ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.

STEMMLER, M. P. Cadherins in development and cancer. **Mol Biosyst**, v.4, n.8, p. 835-850, 2008. <https://doi.org/10.1039/b719215k>

TANAKA, N.; ODAJIMA, T.; OGI, K.; IKEDA, T.; SATOH, M.; Expression of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v. 89, p. 557-563, Aug 4. 2003.

SIMIC, P.; ZAINABADI, K.; BELL, E.; SYKES, D. B.; SAEZ, B.; LOTINUN, S.; BARON, R.; SCADDEN, D.; SCHIPANI, E.; GUARENTE, L.; SIRT1 regulates differentiation of mesenchymal stem cells by deacetylating  $\beta$ -catenin. **EMBO Mol Med**, v.5, n.3, p. 430-440, 2013. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201606> <https://doi.org/10.1002/emmm.201390004>

TAKAHASHI-YANAGA, F.; SASAGURI, T. GSK-3 $\beta$  regulates cyclin D1 expression: A new target for chemotherapy. **Cellular Signalling**, v. 20, n. 4, p. 581–589, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.10.018>

THOMPSON, M. C.; FULLER, C.; HOGG, T. L.; DALTON, J.; FINKELSTEIN, D.; LAU, C. C.; CHINTAGUMPALA, M.; ADESINA, A.; ASHLEY, D. M.; KELLIE, S. J.; TAYLOR, M. D.; CURRAN, T.; GAJJAR, A.; GILBERTSON, R. J. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 12, p.1924-1931, 2006. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.4974>

TSUCHIYA, R.; YAMAMOTO, G.; NAGOSHI, Y.; AIDA, T.; IRIE, T.; TACHIKAWA, T.; Expression of adenomatous polyposis coli (APC) in tumorigenesis of human oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 40, p. 932-940, Oct. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2004.04.011>

UESUGI, H.; UZAWA, K.; KAWASAKI, K.; SHIMADA, K.; MORIYA, T.; TADA, A.; SHIIBA, M.; TANZAWA, H.; Status of reduced expression and hypermethylation of the APC tumor suppressor gene in human oral squamous cell carcinoma. **Int J Mol Med**, v. 15, p. 597-602, Apr. 2005. <https://doi.org/10.3892/ijmm.15.4.597>

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. Unidade de Diagnóstico Estomatológico UDE. Acervo de imagens.

URAGUCHI, M.; MORIKAWA, M.; SHIRAKAWA, M.; SANADA, K.; IMAI, K.; Activation of WNT family expression and signaling in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **J Dent Res**, v. 83, p. 327-332, Apr. 2004. <https://doi.org/10.1177/154405910408300411>

WANG, J.; WANG, X.; GONG, W.; MI, B.; LIU, S.; JIANG, B.; Increased expression of beta-catenin, phosphorylated glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , cyclin D1, and c-myc in

laterally spreading colorectal tumors. **J Histochem Cytochem**, v. 57, p. 363-371, Apr. 2009. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.953091>

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 309-316, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 36, p. 575-580, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x>

WILTING, J.; PAPOUTSI, M.; CHRIST, B.; NICOLAIDES, K. H.; VON KAISENBERG, C. S.; BORGES, J. The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. **FASEB J.**, v. 16, p. 1.271-1.273, 2002.

WONG, C. M.; FAN, S. T.; NG, I.O. Beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. **Cancer**, v. 92, p. 136-145, Jul 1. 2001.

YU, Z.; WEINBERGER, P.M.; PROVOST, E.; HAFFTY, B. G.; SASAKI, C.; JOE, J.; CAMP, R. L.; RIMM, D. L.; PSYRRI, A. Beta-Catenin functions mainly as an adhesion molecule in patients with squamous cell cancer of the head and neck. **Clin Cancer Res**, v. 11, p. 2.471-2.477, Apr 1. 2005.

ZHANG, J.; TIAN, X. J.; ZHANG, H.; TENG, Y.; LI, R.; BAI, F.; ELANKUMARAN, S.; XING, J. TGF- $\beta$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition proceeds through stepwise activation of multiple feedback loops. **Sci Signal**, v. 30, n. 7, p. 345-3 91, 2014.

ZHENG, H. C.; XU, X. Y.; XIA, P.; YU, M.; TAKAHASHI, H.; TAKANO, Y.; Involvement of inactive GSK3 $\beta$  overexpression in tumorigenesis and progression of gastric carcinomas. **Hum Pathol**, v. 41, p. 1.255-1.264, 2010.

## ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Uberlândia/MG

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** ESTUDO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/BETA-CATENINA EM AMOSTRAS DE CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CAVIDADE BUCAL E SUA RELAÇÃO COM FATORES DE PROGNÓSTICO

**Pesquisador:** Paulo Rogério de Faria

**Versão:** 1

**Instituição:** Universidade Federal de Uberlândia/ FUFU/ MG

**CAAE:** 00593312.1.0000.5152

### PARECER DO COLEGIADO

**Número do Parecer:** 5715

**Data da Relatoria:** 03/02/2012

#### Apresentação do Projeto:

O câncer bucal constitui-se em um importante problema que aflige não somente o Brasil. Aqui, o câncer bucal está situado entre as 10 mais frequentes neoplasias e as 20 maiores causas de morte na população. Apresenta prognóstico ruim, pois a maioria é diagnosticada nos estágios III e IV. É nesse contexto que o câncer de boca pode ser considerado como um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo e esforços têm que ser tomados para descobrir os mecanismos que norteiam o seu desenvolvimento bem como a sua progressão. Nesse sentido, a via de sinalização Wnt e seus produtos gênicos (proteína APC, beta-catenina, c-myc, ciclina D1 e GSK3beta) aparecem como fortes candidatos no sentido de compreender os mecanismos moleculares que culminam com a transformação maligna e progressão tumoral, em especial o câncer de boca. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é identificar a expressão de produtos gênicos relacionadas à via canônica da ativação do gene Wnt (GSK $\beta$ ,  $\beta$ -catenina, ciclina D1, c-myc, APC) em carcinomas epidermóides bucais e verificar sua associação com o comportamento biológico tumoral e o prognóstico dos pacientes acometidos. O estudo será realizado a partir de uma amostra inicial de 243 carcinomas Epidermóides Bucalis (CEB) diagnosticados e/ou tratados no Complexo Hospitalar da Universidade Federal de Uberlândia (Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina, Hospital Odontológico e Hospital do Câncer) entre 2006 e 2013 (amostra retrospectiva e prospectiva). Serão incluídos no estudo todos os casos com diagnóstico de CEB (ou sinônimos: carcinoma epidermóide, carcinoma espinocelular) acometendo os tecidos bucais, lábio e orofaringe, correspondendo aos seguintes códigos CID: C00 a C06 e C09 e C10. Para os casos já coletados e para os novos casos (a partir de 2012 até 2013), a coleta dos dados foi e será baseado na utilização de um instrumento de coleta qualificado como um questionário semiestruturado onde constam os itens a serem coletados, a saber: dados relativos às características demográficas e sócio-econômico-culturais dos pacientes como: idade, sexo, cor; sobre comportamentos relacionados à doença: uso de produtos de fumo e álcool; e sobre as características clínico-patológicas da doença: tempo de evolução, localização, dimensão e estadiamento baseado nos critérios do Sistema de Estadiamento da International Union Against Cancer. Também serão coletados, em formulário próprio, dados decorrentes da análise histopatológica dos casos incluídos no estudo, tais como, grau de diferenciação tumoral, profundidade de invasão tumoral, invasão angiolinfática e invasão neural e/ou perineural. Para detecção das proteínas relacionadas à via de sinalização Wnt será realizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. A avaliação da imuno-histoquímica para cada proteína será feita pela técnica do Quickscore, que relaciona intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas. Os dados serão descritos por meio de estatística descritiva considerando, quando pertinente, o emprego de médias e /ou medianas, e frequências relativas (percentuais). Serão empregados os testes do Qui Quadrado de Pearson para análise de regressão logística univariada para avaliação das diferentes variáveis estudadas quanto a sua associação com metástases linfonodais, considerando os diferentes antígenos pesquisados, acompanhada de medidas de associação (odds ratio), considerando, a priori, valor de p 0,20. Posteriormente, os dados selecionados quanto a significância serão testados em modelo de regressão logística, para valores de p 0,05. A análise de sobrevida considerará a construção de curvas de sobrevida (Kaplan-Meyer) e analisadas por meio do teste de Log-Rank considerando valores de p0,05 para rejeitar a hipótese de nulidade. Cada antígeno pesquisado será considerado individualmente na análise. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism, versão 4,01 (Graphpad Inc, USA, 2005).

#### Objetivo da Pesquisa:

Identificar a expressão de produtos gênicos relacionadas à via canônica da ativação do gene Wnt (GSK $\beta$ ,  $\beta$ -catenina, ciclina D1, c-myc, APC) em carcinomas epidermóides bucais e verificar sua associação com o comportamento biológico tumoral e o prognóstico dos pacientes acometidos.

Objetivos específicos: 1. Identificar e quantificar a expressão dos antígenos (GSK $\beta$ ,  $\beta$ -catenina, ciclina

D1, c-myc, APC) nos casos de carcinomas epidermóides atendidos e tratados no complexo hospitalar da Universidade Federal de Uberlândia. 2. Analisar a presença de associação entre a expressão dos diferentes produtos gênicos mencionados no item 1 com fatores clínico-patológicos dos casos incluídos no estudo. 3. Analisar, comparativamente, a expressão dos produtos gênicos da ativação do gene Wnt já mencionados (item 1) nos casos de carcinomas epidermóides bucais primários com comportamentos biológicos distintos

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

O presente projeto tem por objetivo investigar a existência de associação dos fatores sócio-demográficos e clínico patológicos de uma amostra de pacientes com câncer bucal (carcinomas epidermóides de boca) com a expressão dos antígenos GSK3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenina, ciclina D1, c-myc, e APC, visando identificar o poder discriminador da expressão destes antígenos de tumores com comportamentos biológicos distintos e prognóstico. Para tanto, utilizaremos uma planilha de banco de dados que está em construção, da qual constam dados cuja natureza foi mencionada anteriormente, dos pacientes com câncer bucal atendidos e tratados no Hospital de Clínicas e Hospital de Câncer em Uberlândia e dados provenientes de análises histológicas que se basearam na avaliação de fragmentos de tumor provenientes de cirurgias realizadas para seu tratamento. Estes fragmentos serão tratados em ambiente de laboratório, sem nenhum envolvimento dos pacientes nestes procedimentos. Assim, todos os dados serão coletados mediante a utilização de um questionário próprio, já empregado anteriormente em outra pesquisa aprovada neste Comitê, referente ao trabalho da CD Cizelene Veloso Faleiros Guedes, intitulado:  $\zeta$  Avaliação do atraso no diagnóstico e tratamento de carcinoma espinocelular em cabeça e pescoço  $\zeta$  e de Iniciação Científica das alunas Natália Vieira Gonçalves, sub projeto do projeto supracitado, e de Natália Pereira Alves referente ao projeto  $\zeta$  Carcinoma epidermóide bucal: estudo dos fatores associados ao diagnóstico de doença avançada  $\zeta$ , com registros CEP aprovados sob os números 250/08; 202/09 e 264/11, respectivamente. Todos os dados serão coletados posteriormente a adesão espontânea do paciente a pesquisa e sua assinatura no termo de consentimento livre e esclarecido sobre o conteúdo do trabalho. Nesta planilha, os pacientes são identificados segundo o número de seus prontuários, codificados de forma a não permitir ao leitor sua identificação e a procedência dos dados. Todos os dados coletados estão relacionados ao próprio paciente e a sua doença, sem que seja necessária a sua manipulação ou mesmo a intervenção direta do profissional no paciente, de qualquer tipo para diagnóstico ou tratamento das lesões. Isto será realizado na oportunidade do seu exame clínico ou mesmo da biópsia indicada pelos profissionais nas diferentes clínicas nas quais será atendido, não necessitando, portanto, sua presença no ambiente hospitalar somente para a coleta dos dados. Desta forma, o único risco presente na pesquisa em relação ao paciente é a sua possível identificação na pesquisa, no entanto haverá todos os esforços possíveis e o devido comprometimento da equipe executora com o sigilo absoluto da identidade do sujeito.

**Benefícios:** Os benefícios para o paciente estão relacionados ao próprio objetivo do projeto, já que visa identificar os fatores preditivos e associados ao processo de metástases, baseados na expressão dos antígenos supracitados. Isto constituirá informação relevante na formulação de intervenções que visem a minimizar o padrão de diagnóstico inadequado ao tratamento e prognóstico da doença para os pacientes.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa com relevância científica e social. Apresenta ampla revisão sobre o estado da arte dos processos relacionados ao tema em estudo.

Não apresenta comprometimento ético

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

##### **Recomendações:**

Aprovar o projeto com as avaliações subsequentes dos relatórios a serem apresentados.

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

APROVAÇÃO do projeto de pesquisa

##### **Situação do Parecer:**

Aprovado

##### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

##### **Considerações Finais a critério do CEP:**

, 24 de Fevereiro de 2012

Assinado por:

Sandra Terezinha de Farias Furtado

## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada “*Estudo da expressão de proteínas via de sinalização wnt/beta-catenina em amostras de carcinomas epidermóides de cavidade bucal e sua relação com fatores de prognóstico*”, sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria.

Nesta pesquisa nós estamos buscando identificar e entender fatores relacionados ao comportamento do tumor (carcinoma epidermóide bucal, carcinoma de células escamosas bucais) e fatores que possam explicá-los visando melhorar a detecção de metástases e o tratamento da doença. Desta forma, nos comprometemos a coletar os dados apenas no momento do atendimento do paciente na sua consulta previamente agendada e na utilização dos materiais biológicos provenientes da biopsia e do seu tratamento.

Na sua participação você será submetido à aplicação de um questionário semi-estruturado, contendo perguntas sobre os dados de sexo, idade, cor, comportamentos relacionados à doença, e características clínicas da doença. Esclarecemos que estes dados serão anotados em formulário específico que, após o seu uso, serão totalmente destruídos.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Desta maneira, o único risco presente nesta pesquisa é a sua possível identificação, no entanto haverá todos os esforços possíveis e o devido comprometimento da equipe executora com o sigilo absoluto da sua identidade.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Não haverá, portanto, nenhum risco orgânico ou de natureza psicológica para você. Os benefícios serão aqueles decorrentes da própria investigação, ou seja, identificar fatores relacionados ao diagnóstico de metástases e na repercussão do tratamento que poderá ser importante na resposta ao tratamento da doença.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Paulo Rogério de Faria e Flávia Sayuri Matsuo, Sala 2B256 (Laboratório de Histologia –

ICBIM/UFU), Umuarama – Uberlândia (MG), telefone: (34) 3218-2240, Ramal 23. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131

Uberlândia, de de .

---

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Participante da pesquisa

## ANEXO C – Questionário de Entrevista

Prontuários: HC: \_\_\_\_\_ Onco: \_\_\_\_\_ Odonto: \_\_\_\_\_

**Questionário de entrevista***A precisão dos dados anotados nesse formulário é fundamental para a aceitação científica desse trabalho***Dados demográficos**

Idade: \_\_\_\_\_ anos

Sexo:  Masculino  FemininoCor ou raça informada:  Branca  Preta  Parda  Amarela  Indígena**Dados sócio-econômico-culturais**

Profissão nos últimos dez anos: \_\_\_\_\_

Em atividade:  Sim Não:  Aposentado  
 Inválido  
 DesempregadoEscolaridade:  Analfabeto Primário incompleto Primário completo Secundário incompleto Secundário completo Superior incompleto Superior completo

Renda em salários mínimos: \_\_\_\_\_

**Hábitos alimentares**

Frequência em dias em que ingere:

- Arroz e feijão: \_\_\_\_\_ dias / semana

- Carne: \_\_\_\_\_ dias / semana

- Vegetais: \_\_\_\_\_ dias / semana

**Consumo de agentes carcinógenos para a mucosa bucal**

Quanto ao consumo de fumo, você:

 Nunca fumou  
 É ex-fumante  
 É fumante ativo

Qual produto você consome / consumia predominantemente:

 Cigarro industrial com filtro  
 Cigarro de palha / rolo  
 Cachimbo  
 Fumo de mascar

Qual é a quantidade consumida por dia: \_\_\_\_\_

Idade em que iniciou o uso: \_\_\_\_\_ anos

Usa ou já usou outro tipo de fumo?

 Não  
 Sim

Ex-fumante: há quanto tempo abandonou o hábito? \_\_\_\_\_

Tem filhos?  Não  Sim: Algum deles consome cigarro?  Não  SimVocê consome algum tipo de bebida alcoólica?  Não  Sim

Entrevista

Prontuários: HC: \_\_\_\_\_ Onco: \_\_\_\_\_ Odonto: \_\_\_\_\_

Qual o tipo de produto ingerido com maior frequência?:  Fermentado / cerveja  
 Destilado / cachaça / whisky

Qual a frequência mais comum de ingestão?  Diária  
 Semanal  
 Mensal  
 Ocasional

Qual a quantidade consumida em cada ocasião?: \_\_\_\_\_

Qual a idade em que você iniciou o uso: \_\_\_\_\_

### Higiene e saúde geral e bucal

Sua residência possui:  Água encanada?  Rede de esgoto?  
 Asfalto na rua?  Rede de energia?

Você teve acesso a alguma dessas benfeitorias há menos de cinco anos?  Não  Sim

Como você geralmente obtém acesso a dentista?  Serviço público / posto de saúde / UAI  
 Serviço público / faculdade  
 Atendimento particular / convênio

Como você geralmente obtém acesso a médico?  Serviço público / posto de saúde / UAI  
 Serviço público / faculdade  
 Atendimento particular / convênio

Sua última consulta com dentista (fora da UFU) foi relacionada à lesão?  Não  Sim

Há quanto tempo foi realizada a última consulta com dentista, exceto para examinar a lesão? \_\_\_\_\_

De quem foi a orientação para procurar tratamento para a doença?  
 Próprio paciente  Familiares  Farmacêutico  Dentista  Médico

O que você acha que foi a causa da doença? \_\_\_\_\_

Alguém da sua família já teve câncer:  de boca?  de garganta?  de pulmão?)

### Dados sobre a lesão

É dolorosa?  Não  Sim  
 Apresenta sangramento?  Não  Sim

Há quanto tempo foi notada? \_\_\_\_\_ meses

Quem primeiro viu a lesão?  
 Próprio paciente  Familiares  Farmacêutico  Dentista  Médico