

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é representado na sua maioria pelo carcinoma escamocelular (CEC), que acomete as vias aereodigestivas superiores, e está entre os seis tipos de câncer mais prevalentes no sexo masculino e entre os oito no sexo feminino (DEDIVITIS, et al., 2004). O CCP não recebe a devida atenção, principalmente quando é comparado com outras formas de câncer mais prevalentes. Isso permanece como problema de saúde importante, especialmente quando se trata do elevado custo para a sociedade (MENZIN; LINES; MANNING, 2007). O Ministério da Saúde (INCA, 2005) estimou para o ano de 2006, 13.470 novos casos de câncer de boca, segundo localização primária. Já para o ano de 2008, a estimativa prevista é de 14.160 novos casos de câncer de boca, segundo sua localização primária, sendo 10.380 casos em homens e 3.780 em mulheres (INCA, 2007).

Na nossa realidade, poucos são os cirurgiões dentistas que diagnosticam e encaminham o paciente para o tratamento adequado, seja pela inexperiência deste profissional em reconhecer as lesões bucais, ou pelo baixo poder aquisitivo da população que dificulta o acesso ao tratamento odontológico (DEDIVITIS, et al., 2004). Sendo assim, um dado bastante problemático é o fato do diagnóstico das lesões ocorrerem em estágios mais avançados, resultando em pior prognóstico para o paciente (VEECK et al., 1992; CARVALHO et al., 2001; GERVÁSIO et al., 2001; DEDIVITIS, et al., 2004; IYPE et al., 2004; DURAZZO et al., 2005). Por outro lado, lesões diagnosticadas em estágios iniciais, com dimensões ainda reduzidas podem ter evolução surpreendentemente agressiva, tornando necessário o entendimento dos fatores associados ao seu comportamento biológico.

Existem diversos sistemas de graduações histológicas de malignidade que visam fornecer informações preditivas do prognóstico do CEC, embora não tenha sido estabelecido, ainda, um sistema que possa fazer isso com segurança. Por isso, muitos estudos têm se dedicado a estudar as bases moleculares da carcinogênese e a mutação de oncogenes chaves no processo da regulação, diferenciação e proliferação celular, através de técnicas como a hibridização *in situ*, a reação em cadeia polimerase (PCR) e a imunistoquímica.

Apesar das tentativas, ainda não existe bons marcadores de imunistoquímica que possam predizer o prognóstico ou a resposta à terapia em pacientes com casos avançados de CEC de cabeça e pescoço (RODRIGUEZ-PINILLA et al., 2005). Atualmente, no meio científico, diversas proteínas vêm se destacando como marcadores promissores da biologia da carcinogênese, dentre algumas, pode-se citar a  $\beta$ -catenina e a família de proteínas Wnt, cujo envolvimento com a progressão tumoral está demonstrado em alguns estudos (RODRIGUEZ-PINILLA et al., 2005; YANG et al., 2006; KIKUCHI; YAMAMOTO, 2008).

A proteína  $\beta$ -catenina encontra-se comumente na célula normal, sendo um dos componentes do complexo de proteínas da membrana plasmática, responsável pela junção entre as células. Além disso, sua presença também pode ser verificada no citoplasma celular, mediante a ação do sistema de sinalização celular da via clássica ou canônica do Wnt, onde ela é responsável pela transcrição de genes no núcleo. Por apresentar mais de uma função na célula, diz-se que esta proteína apresenta função dual (KOBAYASHI et al., 2002; RODRIGUEZ-PINILLA et al., 2005; ISHIDA et al., 2007; WANG et al., 2007). Pesquisas desenvolvidas, demonstraram a íntima relação dessa proteína na carcinogênese, principalmente quando relacionada à adesão celular, pois se verificou que a sua degradação, ou seja a redução de sua

expressão na membrana celular pode ser indicativa da presença de invasão e metástase do CEC (KUDO et al., 2004; LOPEZ-GONZALEZ et al., 2004; WANG et al., 2007).

As proteínas Wnt incluem uma família de glicoproteínas compostas por 19 membros que uma vez secretadas, desempenham funções durante o desenvolvimento celular, atuando na proliferação e determinação da morte celular (CADIGAN; NUSSE, 1997; MILLER, 2001). Atualmente, já foi demonstrado que existem três vias de sinalização Wnt, e que cada proteína participa de uma via exclusiva (PRUNIER; HOCEVAR; HOWE, 2004; KIKUCHI; YAMAMOTO; KISHIDA, 2007). As Wnts que participam da via clássica ou canônica, são responsáveis pela sinalização da  $\beta$ -catenina no citoplasma (BEHRENS; LUSTIG, 2004). A Wnt-5a, participa de uma segunda via, chamada de Wnt/ $\text{Ca}^{+2}$  (PRUNIER; HOCEVAR; HOWE, 2004).

Diversas pesquisas foram realizadas para verificar a existência ou não da participação desta via na sinalização da  $\beta$ -catenina, entretanto ainda não existe consenso da sua possível participação. Em relação à Wnt-5a, sabe-se que uma de suas funções está no desenvolvimento do sistema nervoso embrionário (BLANC et al., 2005). Estudo realizado por Clark et al., (1993) verificou que a presença desta proteína em tecido humano ocorre apenas em células de coração e pulmão de neonatos e que sua expressão é totalmente suprimida em tecido adulto. No CEC de boca foi relatado a super expressão dos genes Wnt nas células neoplásicas e, a partir dessas observações, sugeriu-se a possibilidade de que a inibição dos sinais do Wnt possa ser alvo potencial na supressão da progressão tumoral (URAGUCHI et al., 2004). Em relação à Wnt-5a, já foi verificado o seu envolvimento na progressão de melanomas e em câncer de mama invasivo (BLANC et al., 2005).

Desta forma, o presente estudo objetivou graduar histologicamente espécimes com diagnóstico de CEC de boca e correlacioná-lo com a expressão imunohistoquímica da proteína  $\beta$ -catenina e da Wnt-5a.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR**

Diversas pesquisas são desenvolvidas a respeito do câncer bucal, em especial ao CEC, tanto na questão epidemiológica, quanto na sua base biológica. Isso se deve, possivelmente, a sua expressiva representatividade na população mundial. Estudo realizado por Kim et al., (2003), com o objetivo de traçar o perfil epidemiológico de coreanos com CCP, verificou que 16,5% dos casos eram representados pelo câncer de boca, sendo que desse total 81,8% estava representado na forma de CEC. Resultado semelhante foi encontrado na população brasileira, onde no período de 1994 a 2002, 374 pacientes com câncer bucal foram avaliados. A representação da doença na forma de CEC foi observada em 90,3% dos indivíduos. Dentre os sintomas, encontrava-se a presença de lesão na cavidade bucal associada à dor local (DURAZZO et al., 2005).

O perfil epidemiológico do CEC de boca relaciona-se a indivíduos do gênero masculino e que apresentaram em sua maioria como hábito, o tabagismo e a ingestão de bebidas alcoólicas, podendo essas serem de uso isolado ou associado (VEECK et al., 1992; CARVALHO et al., 2001; GERVÁSIO et al., 2001; AMORIM; AMORIM; FREITAS, 2002; PERUSSI et al., 2002; KIM et al., 2003; DEDIVITIS, et al., 2004; DURAZZO et al., 2005). Apesar do consenso pela predileção do CEC ao gênero masculino, o acometimento desta lesão em mulheres não deve ser descartado. Estudo brasileiro, verificou aumento na incidência de CEC em mulheres (31,8%), sugerindo que esse resultado possa estar associado a possível mudança nos hábitos femininos, principalmente no que condiz ao número de mulheres etilistas

e tabagistas (DURAZZO et al., 2005). Em outros países, dados semelhantes foram encontrados, como na Austrália, onde estudo realizado em 116 pacientes portadores de câncer de boca encontrou razão de acometimento entre homens e mulheres de 1,3:1 (CHANDU; ADAMS; SMITH, 2005). A faixa etária mais acometida está compreendida entre a quinta e sexta década de vida (VEECK et al., 1992; CARVALHO et al., 2001; GERVÁSIO et al., 2001; AMORIM; AMORIM; FREITAS, 2002; PERUSSI et al., 2002; KIM et al., 2003; DEDIVITIS, et al., 2004; CHANDU; ADAMS; SMITH, 2005), porém a presença dos fatores etiológicos também pode desenvolver o CEC de boca em indivíduos jovens em idade inferior a 35 anos (IYPE, 2004).

Ainda em relação aos fatores de risco, verificou-se em pacientes habitantes do sul da Inglaterra, diagnosticados com câncer bucal e com idade igual ou inferior a 45 anos que em relação ao tabagismo, 61% dos homens e 44% das mulheres eram fumantes no momento do diagnóstico e, desse total 57% dos homens e 44% das mulheres fumavam de 11-20 cigarros por dia a mais de 21 cigarros por dia. Apenas 25% dos homens e 40% das mulheres nunca haviam fumado. Em relação ao etilismo, 88% dos homens e 68% das mulheres consumiam álcool com regularidade. Desse total, 70% dos homens e 53% das mulheres faziam o uso em quantidade superior àquela recomendada por semana. A associação entre os dois hábitos foi verificada em 50% dos homens e 32% das mulheres. Concluiu-se, portanto, que os fatores de risco do câncer bucal são os mesmos para indivíduos jovens e de idade mais avançada (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2004).

Entre os sítios anatômicos intra bucais associados a estes fatores etiológicos encontram-se a base de língua, e o assoalho da cavidade bucal (VEECK et al., 1992; CARVALHO et al., 2001; GERVÁSIO et al., 2001; AMORIM; AMORIM;

FREITAS, 2002; PERUSSI et al., 2002; KIM et al., 2003; LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2004; DURAZZO et al., 2005; BELL et al., 2007).

O tratamento do CEC é baseado na remoção cirúrgica com margem de segurança, e a depender do estadiamento clínico, o tratamento pode ser acompanhado da radioterapia e/ou da quimioterapia (IYPE et al., 2004; KADEMANI et al., 2005). Apesar dos avanços tecnológicos como a descobertas e aperfeiçoamento de terapias alternativas como a radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e a terapia fotodinâmica para o tratamento do câncer nos últimos 50 anos (SCULLY; BAGAN, 2007), o prognóstico para o CEC continua sombrio, uma vez que a base molecular do CEC de boca ainda não é muito bem compreendida e envolve múltiplos eventos genéticos que culminam na carcinogênese, incluindo a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor (WILLIAMS, 2000; BELL et al., 2007). Estima-se que a sobrevida seja de 40% no primeiro ano reduzindo para 10% no quinto ano (PERUSSI et al., 2002). Diversas teorias têm sido postuladas para explicar as diferenças de sobrevida entre os indivíduos. Dentre elas incluem-se as diferenças na predisposição genética, a diferença no tratamento oferecido e aceitado pelo paciente, acesso ao serviço de saúde, a condição sócio-econômico, a apresentação e comportamento da lesão no momento do diagnóstico e as diferentes exposições aos fatores de risco associado (NICHOLS; BHATTACHARYYA, 2007).

Na intenção de se verificar a existência de diferença do câncer em língua para as outras regiões, analisando a localização como fator de prognóstico significativo para o tempo de sobrevida ou o tempo de sobrevida livre da doença, estudo realizado por Bell et al., (2007), verificou que a graduação histológica e o estágio clínico do tumor são fatores de prognóstico significantes para o tempo de sobrevida

ou o tempo de sobrevida livre da doença. Entretanto, não existe diferença de sobrevida entre pacientes com câncer de língua e de outras localizações da boca.

Em estudo realizado por Nichols; Bhattacharyya (2007), nos Estados Unidos, cujo objetivo foi o de caracterizar as diferenças de sobrevida entre indivíduos brancos e negros com CEC de cabeça e pescoço, observou que dos 1919 indivíduos que apresentaram a lesão na região de língua, 151 ocorreram em negros, enquanto 1768 em brancos, sendo a média de idade para indivíduos negros e brancos respectivamente 58,1 e 62,2 anos. No momento do diagnóstico, quando avaliado o estágio T (correspondente a localização primária do tumor) e N (correspondente a presença de metástase em linfonodo regional), este era estatisticamente maior em indivíduos negros. Dos 151 pacientes negros com câncer de boca, 43 apresentaram a mesma idade, sexo, ano do diagnóstico, estágio e tratamento de indivíduos brancos. A média de sobrevida para esses pacientes foi 66,1 meses para negros e 74,8 meses para brancos. Apesar de não se ter relação estatisticamente significativa, os autores sugeriram que é possível haver pior prognóstico para indivíduos negros, uma vez que os mesmos acreditam que possivelmente fatores intrínsecos e extrínsecos podem separadamente influenciar a sobrevida desses pacientes.

Avaliando-se a distribuição do tamanho do CEC de boca e as demais variáveis, estudo realizado em Salvador-BA-Brasil, observou que para lesões com tamanhos maiores (T3 e T4); o sexo masculino, a cor/raça preta e parda, o estado civil divorciado, a idade maior do que 15 anos para início do hábito de fumar e a presença do hábito do etilismo foram mais prevalentes em tumores maiores, diferenças essas estatisticamente significantes (GÓES, 2007).

Diversos autores vêm buscando, incessantemente, por sistemas de estadiamento clínico e graduação histológica de neoplasias malignas que têm como objetivo fornecer informações para o estabelecimento da terapêutica mais adequada a cada indivíduo, assim como auxiliar na predição do curso clínico da doença (RIPPEY, 1998). A utilização de peças obtidas através de biópsias incisionais para avaliação histológica pode prover informação adicional com referência à atividade biológica do tumor através do uso de marcadores biológicos que visam prognosticar o comportamento e agressividade do tumor no momento da biópsia, o que capacitará o médico especializado a escolher terapias específicas a cada paciente (KADEMANI et al., 2005).

## **2.2 GRADUAÇÃO HISTOLÓGICAS DE MALIGNIDADE**

Em se tratando do CEC de boca, o estadiamento clínico não é suficiente para predizer a sua evolução, pois algumas lesões de pequeno tamanho, podem ter comportamento surpreendentemente agressivo (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1987). Por esse motivo, o sistema de graduação histológica de malignidade (GHM) ideal deveria fornecer informações mais acuradas sobre o comportamento biológico da lesão.

Broders (1941) foi o pioneiro na tentativa de classificar os tumores sob o ponto de vista da histopatologia. Este autor propôs um sistema de GHM baseado fundamentalmente na proporção de células que se assemelhassem ao epitélio normal. De acordo com esse critério, os tumores seriam divididos em bem diferenciados (até 25% de células imaturas), moderadamente diferenciados (de 25%

a 50% de células imaturas), pouco diferenciados (de 50% a 75% de células imaturas), ou ainda em indiferenciados (mais de 75% de células imaturas).

Enneroth, Hjertman e Morberger (1972) avaliaram carcinomas escamocelulares de 123 indivíduos com lesão em palato e classificaram histologicamente os casos em bem diferenciados e pouco diferenciados. Para estabelecer o grau de diferenciação, os autores basearam-se na presença de ilhotas e cordões epiteliais tumorais bem definidos e no grau de queratinização das células tumorais. Os indivíduos portadores de tumores pouco diferenciados apresentaram maior índice de metástases e menor sobrevida que os demais.

Jackobsson et al., (1973) além da população celular tumoral, valorizaram a reação do hospedeiro à agressão tumoral. Os critérios de análise incluíram a morfologia das células tumorais, a avaliação do grau de invasão vascular e o infiltrado inflamatório em resposta à neoplasia. Os autores demonstraram a presença de correlação entre a GHM, o percentual de recidivas e a taxa de sobrevida para 5 anos.

Em 1984, este sistema foi modificado por Anneroth e Hansen. A invasão vascular foi omitida devido à dificuldade de definição e reconhecimento desse parâmetro. De acordo com os autores, a nova metodologia demonstrou a relação existente entre o grau de malignidade e o estadiamento clínico dos tumores e a sobrevida dos pacientes. Essa metodologia foi posteriormente aplicada e validada em estudo abrangendo 89 pacientes, todos com diagnóstico de carcinoma escamocelular em assoalho bucal (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1986). A análise estatística demonstrou que a reprodutibilidade desse sistema foi válida para todos os parâmetros morfológicos analisados e que existiu correlação entre a GHM,

o estadiamento clínico, a frequência de recidivas e a sobrevida dos pacientes após cinco anos do diagnóstico do tumor primário.

Em 1987, Anneroth, Batsakis e Luna detalharam o novo sistema de GHM, que considerava a população celular tumoral e a resposta do hospedeiro. Os autores utilizaram como parâmetros para a avaliação da população celular tumoral os critérios de grau de queratinização, pleomorfismo nuclear e número de mitoses. Para a resposta do hospedeiro à neoplasia, foram utilizados como critérios de avaliação o padrão de invasão tumoral, o estágio de invasão e o infiltrado linfoplasmocitário reacional. O escore relativo à graduação de cada tumor foi obtido através da média aritmética dos escores de cada parâmetro utilizado.

O sistema de graduação de malignidade proposto por Anneroth, Batsakis e Luna (1987) foi aproveitado por Bryne et al., (1991) para avaliar o grau de queratinização, o pleomorfismo nuclear, o número de mitoses, o padrão de invasão e o infiltrado linfoplasmocitário em biópsias incisionais de CEC de boca. Porém, somente as células nas margens mais invasivas do tumor foram graduadas e os escores originais de 1 a 4 propostos por Anneroth, Batsakis e Luna (1987) foram modificados de acordo com curvas de sobrevida traçadas para cada escore. Assim, os escores que demonstraram curvas semelhantes foram agrupados numa tentativa de simplificar a análise. A análise dos resultados permitiu aos autores afirmar que nenhuma das características morfológicas do sistema de graduação de malignidade deveria ser excluída, já que todas apresentaram correlação com o prognóstico. A concordância para parâmetros isolados não foi maior que a do sistema como um todo e a redução do número de escores de cada parâmetro não aumentaram o valor prognóstico, nem melhorou o índice de concordância entre pesquisadores.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO) (2005), o CEC de boca pode ser classificado como bem diferenciado, moderadamente e pouco diferenciado. Ele é histologicamente classificado como bem diferenciado quando se assemelha ao epitélio escamoso normal. O CEC moderadamente diferenciado apresenta pleomorfismo nuclear e atividade mitótica distintos, incluindo mitoses atípicas e normalmente existe menos queratinização no tecido. Em CEC pouco diferenciado, existe o predomínio de células imaturas, com numerosas mitoses típicas e atípicas, além de mínima queratinização. E apesar da queratinização ser mais comumente presente em CEC bem ou moderadamente diferenciado, este não deve ser considerado como critério importante para graduação histológica desse tumor. Ainda de acordo com a WHO, a maioria dos CEC são moderadamente diferenciados, logo a graduação pela diferenciação tem valor de prognóstico limitado quando comparado com o padrão de invasão.

Muitos são os autores (YEH et al., 2003; DAA et al., 2004; IWAI et al., 2005) que também procuram estudar as bases moleculares da carcinogênese e a mutação de oncogenes no processo da regulação, diferenciação e proliferação celular, através de diversas técnicas, entre elas a imunohistoquímica.

### **2.3 $\beta$ -CATENINA**

As cateninas representam uma família de moléculas representadas pela  $\alpha$ -catenina (102kda),  $\beta$ -catenina (92 kda), e  $\gamma$ -catenina ou plakoglobina (83 kda), cujas localizações gênicas encontram-se respectivamente nos cromossomos 5q31, 3p21 e 17q21. Essas proteínas estão envolvidas com a proteína E-caderina e juntas formam o complexo caderina-catenina. Dentre o grupo das cateninas, a  $\beta$ -catenina

se liga diretamente a porção citoplasmática da E-caderina, motivo pelo qual, esta proteína é objeto de estudo científico (BARTH; NÄTHKE; NELSON, 1997; BEN-ZE'EV; SHTUTMAN; ZHURINSKY, 2000). Além dessas três proteínas, outra molécula denominada de *catenina like* ou p120<sup>cas</sup> foi recentemente descrita e localizada no cromossomo 11q11 (BEAVON, 2000; CUI et al., 2001; FILLIES et al., 2005).

Diversas moléculas são capazes de interagir com a  $\beta$ -catenina. O estudo acerca das funções biológicas da  $\beta$ -catenina pode demonstrar que essa molécula apresenta múltiplas funções, pois combina características de proteína de adesão nas junções entre as células, bem como de fator transcricional através de diferentes vias de sinalização (BARTH; NÄTHKE; NELSON, 1997).

A adesão intercelular é responsável pela morfogênese da célula e do tecido, e pela regulação dos processos celulares de motilidade, crescimento, diferenciação e sobrevivência. A junção aderente célula-célula (AJ), é o tipo de adesão intercelular mais comum sendo importante para a manutenção da arquitetura e polaridade celular, além de poder limitar o movimento e proliferação da célula. A AJ agrega, ainda, a interação da via homofílica entre o domínio extracelular dos receptores caderina/cálcio-dependente na superfície das células vizinhas (BEN-ZE'EV; GEIGER, 1998; NAGAFUCHI, 2001).

Para que haja a ligação intercelular, é necessária a formação de dímeros de E-caderina que se interdigitam originando estrutura linear contínua em forma de “zíper”, sendo essa interação dependente dos níveis de cálcio extracelular. O domínio citoplasmático da E-caderina forma complexo com a  $\beta$ -catenina ou com a  $\gamma$ -catenina. A  $\alpha$ -catenina promove a união do complexo caderina/ $\beta$  ou  $\gamma$ -catenina com as células de actina do citoesqueleto, sendo essa ligação importante para forte

adesão entre as células (JANKOWSKI et al., 1997; BARTH; NÄTHKE; NELSON, 1997; BEN-ZE'EV; GEIGER, 1998; BEAVON, 2000; HIROHASHI; KANAI, 2003; MIGUEL; AMORIM, 2004).

A perda da AJ na adesão normal entre as células associada à desregulação de outras trajetórias de sinalização podem contribuir para o aumento da migração e proliferação das células tumorais, levando a invasão e metástase (SMITH; PIGNATELLI, 1997; CONACCI-SORRELL; ZHURINSKY; BEN-ZE'EV, 2002). A desregulação do complexo caderina/catenina, além da redução da expressão da  $\beta$ -catenina, está presente em vários tipos de malignidade, principalmente as de caráter mais agressivo e com maior potencial de metástase (BARTH; NÄTHKE; NELSON, 1997; BEAVON, 2000). Dessa forma, as cateninas e os complexos intracelulares a ela associados são peças fundamentais para a patogênese e progressão de tumores malignos (FILLIES et al., 2005).

## **2.4 AS Wnts E A Wnt-5a**

Os genes WNT englobam ampla família de secreção de proteínas de fatores de crescimento que vem sendo identificada em animais. Nos humanos, 19 proteínas Wnt foram identificadas (MILLER, 2001). A família Wnt de moléculas sinalizadoras regula numerosos processos no desenvolvimento animal e vem sendo gradativamente envolvida na homeostase de tecido dos organismos adultos (MILLER, 2001; NUSSE, 2005). As proteínas Wnt são secretadas pelas células e atuam em células alvo, sendo essa trajetória complexa e sujeita a intenso controle de *feed-back*. A sinalização de Wnt possui atividade pleiotrópica as quais abrangem da estimulação mitogênica, à diferenciação, mudança de polaridade e adesão

celular diferencial. A natureza da resposta de Wnt é determinada pelas respostas celulares (NUSSE, 2005). A alteração no seu funcionamento está implicada no desenvolvimento de doenças, como as degenerativas e o câncer (MILLER, 2001; NUSSE, 2005).

A trajetória da Wnt apresenta numerosos pontos de transcrição, sendo ativada em algumas células. Essa especificidade é comumente vista no desenvolvimento da trajetória de sinalização, e reflete o mecanismo fundamental do controle gênico pelo sinal extracelular: a célula determina a natureza da resposta. A Wnt também controla genes que são largamente induzidos. Esse grupo de genes inclui componentes de sua própria trajetória ou, dentre esses genes, existem aqueles que são diretamente ativados pela cascata Wnt/ $\beta$ -catenina/fator de célula T (FCT) (NUSSE, 2005).

A sinalização da família Wnt vem sendo demonstrada como elemento fundamental tanto no desenvolvimento embriogênico quanto na variedade de doenças, incluindo-se o câncer (PRUNIER; HOCEVAR; HOWE, 2004; LIU; BAFICO; AARONSON, 2005). Sua trajetória de sinalização é regulada por amplo número de proteínas complexas, as quais atuam como agonistas ou antagonistas da transdução do sinal, modulando a sinalização do Wnt no citoplasma e no núcleo (PRUNIER; HOCEVAR; HOWE, 2004).

Dependendo do contexto de sinalização e da particular combinação Wnt com um receptor específico denominado de *Frizzled* (*Fz*), presente na membrana plasmática da célula, a sinalização intracelular do receptor poderá seguir três trajetórias distintas: a trajetória clássica ou canônica Wnt/ $\beta$ -catenina a qual regula a diferenciação e proliferação celular através da ativação da  $\beta$ -catenina/FCT mediada pela ativação transcripcional de genes Wnt alvos (POLAKIS, 2000; LUSTIG; BEHRENS, 2003; PRUNIER; HOCEVAR; HOWE, 2004; LIU; BAFICO; AARONSON,

2005), a trajetória Wnt/Ca<sup>+2</sup> que é estimulada pela Wnt-5a e Wnt-11 as quais conduzem a elevação do nível de cálcio (Ca<sup>+2</sup>) intracelular e a ativação dos componentes de sinalização sensíveis ao Ca<sup>+2</sup>, como a fosfolipase C, proteína quinase C e proteína quinase II dependente de Ca<sup>+2</sup>-calmodulina (KÜHL et al., 2000; LUSTIG; BEHRENS, 2003; BACHMANN et al., 2005). A trajetória Wnt/Ca<sup>+2</sup> pode promover ação oposta à trajetória canônica, entretanto, esse achado ainda não está claro na literatura (LUSTIG; BEHRENS, 2003), e, por fim, a trajetória Wnt/polarização a qual envolve os receptores *RhoA* e *Jun Kinase* (JNK) sendo a sua principal função a de regular a organização do citoesqueleto (MILLER, 2001; LUSTIG; BEHRENS, 2003). Essas duas últimas trajetórias apresentam funções biológicas pouco compreendidas (MILLER, 2001; ROMAN-GOMEZ et al., 2007).

A Wnt-5a é membro da família de proteínas Wnt cujo sinal ocorre através da trajetória não canônica Wnt/Ca<sup>+2</sup> (ROMAN-GOMEZ et al., 2007). Essa proteína pode estar expressa em ceratinócitos normais e linhagem de fibroblastos gengival (URAGUCHI et al., 2004). Já foi demonstrado que o gene WNT-5A, suposto gene supressor de tumor, é silenciado pela metilização em tumor leucemogênese linfóide e esse evento epigenético está associado com a super expressão do gene da CICLINA D1 e confere pior prognóstico a pacientes portadores dessa lesão (ROMAN-GOMEZ et al., 2007). A atividade da caseína quinase 1 é exigida para a ação da Wnt-5a na diferenciação de precursores dopaminérgicos, sendo a caseína quinase 1 componente essencial para a indução da trajetória de sinalização da Wnt-5a não apenas em algumas linhas celulares, mas em algo mais complexo como a biologia dos tumores (BRYJA et al., 2007).

Foi demonstrado que a Wnt-5a, através da sinalização não canônica pode regular a proliferação e migração das células endoteliais humanas. Supõe-se que

esta proteína possa estar envolvida no desenvolvimento do tumor e da inflamação, induzindo a angiogênese (CHENG et al., 2008).

Danielsom et al., (1995) investigaram a organização genômica, o promotor de atividade e a localização cromossômica do gene WNT-5A, o qual codifica o fator de crescimento rico em cisteína, envolvido na sinalização célula-célula durante o desenvolvimento embriogênico e possivelmente no crescimento tumoral. A localização da transcrição do WNT-5A no desenvolvimento de células somáticas da gônada sugere que a proteína Wnt-5a pode apresentar função, como na sinalização de moléculas em diferentes células germinativas. A diversidade de atuação da Wnt-5a aponta para sua função pleiotrópica.

## **2.5 SINALIZAÇÃO WNT/ $\beta$ -CATENINA**

A família Wnt engloba proteínas de sinalização que influenciam em diversos processos no desenvolvimento animal, através da participação de múltiplos eventos de sinalização durante o processo da embriogênese e tem sido implicada, também, na homeostase do tecido adulto. Os sinais Wnt são pleiotrópicos, com efeitos que incluem estimulação mitógena, estimulação da apoptose e diferenciação celular (JANKOWSKI et al., 1997; CADIGAN; NUSSE, 1997; LUSTIG; BEHRENS, 2003; LOGAN; NUSSE, 2004). A sinalização é iniciada pela ligação da Wnt a duas moléculas receptoras, proteínas *Fz* e proteínas relacionadas ao receptor de lipoproteína 5 e 6 (LRP-5/6) (NELSON; NUSSE, 2004).

A ação da Wnt ocorre através de diversas cascatas de sinalização no interior da célula alvo e dentre elas encontra-se a via clássica ou canônica, onde nesta via, sua trajetória ativa células alvos estabilizando a  $\beta$ -catenina do citoplasma. Na

ausência de Wnt, a  $\beta$ -catenina é fosforilada, em seguida ubiquitinizada e por fim, degradada por proteasomas. Na presença de Wnt, os componentes celulares impedem a degradação da  $\beta$ -catenina através de mecanismo, ainda, pouco conhecido. A  $\beta$ -catenina estabilizada entra no núcleo da célula e associada com outros fatores de transcrição promove a transcrição de Wnt e de outros genes, dentre eles c-myc, c-jun e ciclina D1 em células alvo (SHTUTMAN et al., 1999; LUSTIG; BEHRENS, 2003). Portanto, a função primária da  $\beta$ -catenina na trajetória de sinalização da Wnt é aumentar a transcrição desta proteína através de sua ação direta no núcleo, mais provavelmente recrutando diferentes coativadores transcripcional aos sítios de ligação do FCT aos genes WNT-responsivos (CONG et al., 2003).

Pouco se sabe como Wnt sofre transdução de sinal através da membrana plasmática para regular o complexo de degradação da  $\beta$ -catenina. Existe forte evidência de que a função do domínio extracelular da proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP) é a de interagir funcionalmente com as proteínas Wnt e que estas agem formando hetero-oligomeros com os receptores *Fz* e LRP (CONG;SCHWEISER; VARMOUS, 2004).

A interação da *Adenomatous polyposis coli* (APC) com a axina é importante para a regulação da estabilidade da  $\beta$ -catenina (HINOI et al., 2000). Os níveis citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina são normalmente mantidos baixo diretamente através da degradação mediada por proteasomas, as quais são controladas pelo complexo quinase sintetase glicogênio (GSK)-3/APC/Axina (KISHIDA et al., 1998; WILLERT; NUSSE, 1998; ZHURINSKY; SHTUTMAN; BEN-ZE'EV, 2000; KONH; MOOM, 2005). Esse complexo de múltiplas proteínas regula o *turnover* da  $\beta$ -catenina. Na ausência da sinalização Wnt este sistema de degradação é muito ativo e mantém o

nível de  $\beta$ -catenina baixo através da fosforilação dela pela quinase sintetase glicogênio-3(GSK-3 $\beta$ ) em resíduos específicos de serina na cadeia N-terminal. Esta fosforilação pela GSK-3 $\beta$  é catalizada por grande complexo molecular que inclui a proteína axina, o supressor tumoral APC e várias outras proteínas incluindo a proteína de ligação a GSK (GBP/FRAT) e a fosfatase proteína 2C (BEN-ZE'EV, et al., 2000; HINOI et al., 2000; GORDON; NUSSE, 2006). Na ausência de  $\beta$ -catenina o FCT pode suprimir a transcrição gênica através de variantes negativas dominantes ou em associação com um supressor transcricional, como o *groucho* (LUSTIG; BEHRENS, 2003).

Atualmente, o conhecimento a cerca da sinalização da Wnt é de que esta proteína, uma vez presente na superfície das células sinalizadoras, age nas células alvos através da ligação ao complexo *Fz*/lipoproteína de baixa densidade (LDL) LRP na superfície da célula. Estudos sugerem modelo no qual a proteína Wnt secretada interage diretamente ou indiretamente com receptores codificados pela família do gene *Fz*. Em resposta ao sinal Wnt, os receptores *Fz* ativam as fosfoproteínas *dishevelled* (Dvl) que inibem a atividade da GSK-3 $\beta$ , levando a hipofosforilação da  $\beta$ -catenina, a inibição de seu *turnover*, e conseqüentemente, ao acúmulo de  $\beta$ -catenina hipofosforilada no citoplasma e a redistribuição da  $\beta$ -catenina no núcleo, regiões estas fora da AJ (BARTH; NÄTHKE; NELSON, 1997; WILLERT; NUSSE, 1998; LOGAN; NUSSE, 2004; BEN-ZE'EV, et al., 2000; KOHN; MOOM, 2005).

A estabilização da  $\beta$ -catenina é o evento chave na transdução do sinal Wnt (BARTH; NÄTHKE; NELSON, 1997; WILLERT; NUSSE, 1998; BEN-ZE'EV, et al., 2000; LOGAN; NUSSE, 2004). Uma vez que o nível de  $\beta$ -catenina está elevado no citoplasma da célula, ocorre seu deslocamento para o núcleo e conseqüente acúmulo nessa região, onde ela estará envolvida na ativação transcricional de genes

alvo em complexo com o fator de crescimento linfóide e o fator de transcrição de células T específicas (FCT/LEF) (JANKOWSKI et al., 1997; BEN-ZE'EV, et al., 2000; ZHURINSKY; SHTUTMAN; BEN-ZE'EV, 2000; LOGAN; NUSSE, 2004; KOHN; MOON, 2005; GORDON; NUSSE 2006). A competição entre diferentes parceiros citoplasmáticos e nucleares da  $\beta$ -catenina por *pool* limitado de  $\beta$ -catenina pode determinar se sua função será na adesão ou na transativação dos genes (JANKOWSKI et al., 1997; BEN-ZE'EV; SHTUTMAN; ZHURINSKY, 2000). Sabe-se, ainda, que a célula está envolvida em elaborado sistema de regulação da estabilidade dos níveis de  $\beta$ -catenina. O sistema complexo que modula a quantidade de  $\beta$ -catenina livre envolve diversas proteínas e ainda é pouco compreendido (WILLERT; NUSSE, 1998). Um amplo número de Wnt alvos tem sido identificado. Essas proteínas fazem parte da trajetória de transdução de sinal do Wnt, os quais promovem o controle do *feedback* durante a sinalização do Wnt (LOGAN; NUSSE, 2004).

As proteínas Wnts induzem a hiperfosforilação das proteínas Dvl em células de mamíferos. Algumas Wnts, como a Wnt-1 e Wnt-3a fosforilam da Dvl e ativam ao mesmo tempo a trajetória canônica Wnt de sinalização, levando, conseqüentemente a estabilização da  $\beta$ -catenina. Ao contrário dessas proteínas, a Wnt-5a induz a fosforilação da Dvl, mas não apresenta ação sobre a  $\beta$ -catenina. Dessa forma, a fosforilação da Dvl aparece como conseqüência comum na sinalização de inúmeras proteínas Wnt, sem levar em consideração a capacidade destas proteínas em estabilizar a  $\beta$ -catenina (GONZÁLEZ-SANCHO et al., 2004). Outro estudo demonstrou que Wnt-5a e a Dickkopf-2 C terminal (Dkk2C), esta última pertencente a família Dickkopf antagonista do Wnt, são incapazes de ativar a sinalização da  $\beta$ -catenina. Apenas quando as duas metades dessas proteínas são fusionadas, é

que a sinalização canônica é eficientemente ativada. Além disso, a sinalização canônica realizada pelo Wnt-5a/Dkk2C é inibida pelo domínio negativo tanto do Fz, quanto do LRP. Esses achados mostram que para que haja a sinalização canônica da Wnt endógena é necessário ligante tanto dos coreceptores Fz quanto LRP no mesmo complexo de receptor, particularmente, o mesmo que liga Wnt a cada receptor independentemente (LIU; BAFICO; AARONSON, 2005).

A sinalização da Wnt tem recebido atenção considerável nas pesquisas de câncer nos últimos anos devido a muitos de seus componentes desempenharem importantes funções na carcinogênese. Em tumores, tanto a expressão de Wnts quanto a mutação de um dos componentes responsáveis pela degradação da  $\beta$ -catenina, resulta na estabilização desta proteína e na ativação de genes alvos (LUSTIG, BEHRENS, 2003). A sinalização nuclear pela  $\beta$ -catenina é envolvida na regulação de vários eventos celulares durante o desenvolvimento embrionário e a ativação aberrante da transativação mediada por essa molécula pode contribuir para a progressão do câncer por causar o aumento da proliferação celular (ZHURINSKY; SHTUTMAN; BEN-ZE'EV, 2000).

## **2.6 $\beta$ -CATENINA E Wnt-5a NA CARCINOGENESE**

A literatura já demonstrou que a  $\beta$ -catenina apresenta duas funções aparentemente opostas, mas que são fundamentais durante a formação do câncer (YU et al., 2005): de um lado a  $\beta$ -catenina faz parte do complexo E-caderina/catenina o qual tem sua função limitada a diferentes estágios do desenvolvimento do tumor; e por outro lado, a ativação descontrolada da ativação da capacidade de sinalização da  $\beta$ -catenina promove a formação do tumor. Apesar

desse conhecimento, ainda não está claro a maneira como essas duas funções estão conectadas (BEHRENS, 1999).

A  $\beta$ -catenina apresenta importante função na trajetória de transdução do sinal que regula a diferenciação e proliferação celular. O aumento da concentração desta proteína no citoplasma favorece a ligação com a família do FCT das proteínas ligadas ao DNA e, sua subsequente migração para o núcleo, onde ela induz a transcrição de genes específicos (MIZUSHIMA et al., 2002), como a ciclina D1 e c-myc (SHTUTMAN et al., 1999).

Os níveis intracelulares de  $\beta$ -catenina são regulados por diferentes trajetórias de sinalização e desempenham função central no desenvolvimento do tumor. Sabe-se também que mutações encontradas no GSK-3 $\beta$ , resultam na estabilização da  $\beta$ -catenina (CHEN, DING, MCCORMICK, 2000).

A biologia molecular moderna tem demonstrado a invasão e metástase do tumor como processo contínuo que incluem três etapas: a redução da adesão intercelular, alteração na interação das células tumorais com a matriz extracelular e a invasão dentro e na periferia dos tecidos, incluindo os vasos sanguíneos e os ductos linfáticos (LIN et al., 2004).

O complexo E-caderina/catenina está envolvido em larga extensão na biologia celular do câncer. Já foi observado na literatura diferenças na expressão deste complexo em tumores com diferentes graduações histológicas. Existe forte expressividade na marcação imunoistoquímica para as caderinas e cateninas em carcinomas bem diferenciados, ao contrário dos tumores pouco diferenciados, cuja expressão é reduzida. A possível razão para esse achado é o fato do tumor mais diferenciado, por ser menos invasivo, possa apresentar maior adesividade entre as células (WIJNHOFEN; DINJENS; PIGNATELLI, 2000; HIROHASHI; KANAI, 2003).

A  $\beta$ -catenina, também, desempenha importante função na regulação da atividade proliferativa do câncer de pulmão, onde o aumento dessa atividade está associada com a redução na expressão da  $\beta$ -catenina (PIRINEN et al., 2001; CHOI et al., 2003). A desregulação desta proteína pode apresentar importante função na patogênese em carcinoma seroso de ovário, onde foi observada correlação estatística significativa entre a localização nuclear da  $\beta$ -catenina e carcinoma seroso de ovário com alto grau de malignidade (LEE et al., 2003). E em células de carcinoma endometrial a  $\beta$ -catenina nuclear pode simultaneamente induzir a ativação da trajetória p53-p21 WAF1 e super expressão da ciclina D1, resultando na supressão da proliferação celular ou indução do envelhecimento celular, sugerindo que a acumulação nuclear da  $\beta$ -catenina é sinal inicial da perda de diferenciação (SAEGUSA et al., 2004).

A redução da expressão da  $\beta$ -catenina na membrana plasmática também está associada com a perda de diferenciação celular em CEC de laringe, como observado no estudo realizado por Lopez–Gonzalez et al., (2004), no qual não foi verificada a presença de marcação nuclear pela  $\beta$ -catenina. Em carcinomas pouco diferenciados, a super expressão da  $\beta$ -catenina em citoplasma pode estar associado com alteração em sua degradação pelo complexo APC/GSK 3 $\beta$ /axina, e uma ou todas as trajetórias de sinalização podem participar na redistribuição da  $\beta$ -catenina. Essas possibilidades podem estar associadas a instabilidade genética, a qual está aumentada durante a progressão do tumor.

Lin et al., (2004), investigaram a expressão da E-caderina,  $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina,  $\gamma$ -catenina e ciclina D1 em 62 pacientes com CEC de esôfago e avaliaram suas interrelações com as variáveis clinicopatológicas e seus efeitos no prognóstico. Eles observaram que os pacientes que apresentaram a expressão de

E-caderina preservada, apresentaram melhor prognóstico do que àqueles cuja expressão encontrava-se reduzida, sugerindo que a menor expressão da proteína está relacionada com a perda da adesão celular e a promoção da metástase através do vaso sanguíneo. A expressão da  $\alpha$ -catenina, mas não a da  $\beta$  e  $\gamma$ -catenina estava correlacionada com a expressão da E-caderina. A redução ou perda da expressão da  $\gamma$ -catenina estava mais relacionada a metástase do linfonodo. Sua expressão era menor em tumores pouco diferenciados, e além disso, a redução da sua expressão estava relacionada a baixa sobrevida do paciente. A expressão da  $\alpha$  e  $\beta$ -catenina não foi relacionada ao grau histológico, a profundidade de invasão, a metástase dos linfonodos e ao tempo de sobrevida.

Ninomiya et al., (2000), avaliaram a alteração da expressão da  $\beta$ -catenina e E-caderina em CEC de esôfago em 22 espécimes de amostras de tecido, analisados pelo método *Western-blot*. Redução na expressão de E-caderina,  $\alpha$ -catenina e  $\beta$ -catenina foi observada em 18,2%, 27,3% e 40,9%, respectivamente. Não houve correlação entre os níveis da  $\beta$ -catenina com a E-caderina. A super expressão da  $\beta$ -catenina foi observada em 13,6% dos tumores. Desses casos, dois apresentaram coloração citoplasmática quando analisado pelo método da imunistoquímica. A localização nuclear da  $\beta$ -catenina foi observada em apenas um caso, o qual apresentou alto nível de  $\beta$ -catenina no tecido tumoral. Para avaliar o mecanismo da super expressão da  $\beta$ -catenina e sua localização nuclear, foi examinada a seqüência genômica de DNA contendo seqüências do gene da  $\beta$ -catenina e APC. Nenhuma mutação do gene da  $\beta$ -catenina foi verificada nos casos avaliados. Verificou-se o silenciamento da mutação do gene APC nos casos onde se detectou super expressão ou localização nuclear da  $\beta$ -catenina. Os resultados desse estudo demonstraram a presença de alteração da expressão da E-caderina e cateninas no

CEC de esôfago e que essas alterações pode afetar o sistema de adesão intercelular e a trajetória de transdução de sinal, induzindo a carcinogênese e a progressão do câncer.

Castro et al., (2000) observaram expressão nuclear e citoplasmática da  $\beta$ -catenina em CEC de esôfago, sendo que os tumores que apresentaram marcação nuclear exibiram alta atividade proliferativa, verificada através da marcação pelo Ki-67. E, segundo esses autores, sugere-se que a mutação presente no gene da  $\beta$ -catenina, usualmente, possa ser demonstrada através do acúmulo da  $\beta$ -catenina no citoplasma e no núcleo, verificada pela técnica de imunistoquímica.

Mizushima et al., (2002) avaliaram o papel da Wnt no desenvolvimento e progressão do CEC do esôfago e mostraram que a Wnt-1, durante a sua trajetória promove o acúmulo de  $\beta$ -catenina no citoplasma, com resultado da ativação da transcrição gênica  $\beta$ -catenina/FCT dependente. Esses achados indicam que Wnt-1 pode regular a atividade transcricional de FCT-dependente e da  $\beta$ -catenina nestas células.

Diversos genes WNT de grupos clássico ou canônico e alternado são bastante expressos em células de leucemia quando comparado com células B normal. A expressão de todos os componentes da cascata de sinalização da Wnt pela via canônica, na leucemia linfocitária crônica, juntamente com os efeitos observados da ativação e inibição da  $\beta$ -catenina implicaram na trajetória da Wnt e na patogênese da leucemia linfocitária crônica, sugerindo que isso possa exercer função no aumento do tempo de vida da célula B maligna (LU, et al, 2004). Na leucemia linfoblástica aguda já se verificou que o gene WNT-5A, suposto gene supressor de tumor, é silenciado pela metilação promovida por esta enfermidade e

este evento epigenético confere pobre prognóstico para os pacientes portadores (ROMAN-GÓMEZ et al., 2007).

Cui et al., (2001), estudaram a expressão e mutação da  $\beta$ -catenina em carcinoma hepatocelular em chineses e encontraram que a mutação do exon do gene da  $\beta$ -catenina é um dos fatores mais importantes na ativação da trajetória da Wnt no carcinoma hepatocelular. A partir daí eles concluíram que o gene mutado da  $\beta$ -catenina e sua super expressão podem ser um dos fatores chave que ativam a trajetória anormal Wnt/ $\beta$ -catenina neste carcinoma. Também em carcinoma hepatocelular, Ishizaki et al., (2004), analisaram o acúmulo de  $\beta$ -catenina através da imunohistoquímica e encontraram em 27% das amostras tumorais coloração positiva da proteína no núcleo, indicando que a disfunção na trajetória da Wnt pode existir nesse tumor. E as mutações nos genes da  $\beta$ -catenina e da família Axina estão associadas com essa alteração.

Em tumor de cérebro foi observada, através da reação em cadeia polimerase (PCR), a expressão das proteínas Wnt-5a, Wnt-10b e Wnt-13. É possível que essas proteínas, expressas tanto no tecido cerebral normal quanto no tumor, possam desempenhar papel no desenvolvimento normal do cérebro e na proliferação do tumor de cérebro, respectivamente (HOWNG et al., 2002).

Muitos carcinomas ductal invasivo de mama apresentam perda da expressão da proteína Wnt-5a, ao contrário dos carcinomas de mama lobular. Essa diferença provavelmente ocorre devido a genes diferentes que são ativados durante a indução e progressão desses tipos de carcinoma. A perda da expressão da Wnt-5a está relacionada a tumores menos diferenciados, existindo ainda, associação entre a perda da expressão da Wnt-5a e a presença de metástase regional de linfonodos,

entretanto o mecanismo molecular responsável por esse evento ainda não é bem conhecido (JÖNSSON et al., 2002).

Ao avaliar a expressão da Wnt-5a e do seu receptor *Fz* em tumores melanóticos benignos e malignos, observou-se que a expressão nuclear dessa proteína e do seu receptor foi reduzida em melanomas quando comparado com o nevo benigno, entretanto, em relação à expressão citoplasmática, encontrou-se o oposto, havendo aumento no nível de marcação no melanoma. No melanoma nodular primário, verificou-se marcação da  $\beta$ -catenina no núcleo e no citoplasma, além da redução da expressão em membrana. Houve correlação positiva entre a expressão nuclear da Wnt-5a com a expressão nuclear da  $\beta$ -catenina (BACHMANN et al., 2005).

A proteína Wnt-5a é super expressa em estágios avançado de câncer gástrico, sendo sua expressão diretamente relacionada com o pobre prognóstico. Como consequência, o tempo de sobrevida de cinco anos encontrado nos pacientes com e sem expressão desta proteína foi, respectivamente de 50% e 20%. Esse achado sugere que a imunomarcação da Wnt-5a em células de câncer gástrico, pode ser auxiliar na determinação da terapia específica, após a remoção cirúrgica do tumor. Além disso, a Wnt-5a pode estimular a migração celular e a invasão de células deste tumor através da regulação do complexo de adesão. Ou seja, a Wnt-5a atua como regulador negativo da  $\beta$ -catenina-dependente na proliferação celular. A  $\beta$ -catenina positiva nas células pode prevenir a expressão da Wnt-5a. Entretanto, o mecanismo exato para a expressão da  $\beta$ -catenina e Wnt-5a em câncer gástrico ainda não é bem conhecido (KURAYOSHI et al., 2006).

Pesquisa realizada por Huang et al., (2005) em câncer de pulmão, verificou alta expressão da Wnt-5a quando este tumor estava representado na forma de CEC

e de adenocarcinoma, sendo estatisticamente maior a expressão da proteína na primeira forma do que na segunda. O padrão de expressão da proteína Wnt-5a observado foi o citoplasmático. Com referência a expressão intratumoral dessa proteína, houve grande variação entre as células tumorais positivas. Em relação à expressão tumoral da  $\beta$ -catenina e da Wnt-5a, dos 71 tumores positivos a proteína Wnt-5a, quinze carcinomas exibiram padrão membranoso; vinte e quatro carcinomas apresentaram padrão membranoso/citoplasmático e o padrão citoplasmático/nuclear foi observado em vinte e três carcinomas. Entretanto os autores verificaram que dos 52 carcinomas negativos a proteína Wnt-5a, a expressão da  $\beta$ -catenina também esteve presente, não havendo portanto, diferença estatística significativa entre a expressão da Wnt-5a e da  $\beta$ -catenina. Além disso, não existiu correlação entre a porcentagem de células tumorais positivas a Wnt-5a e a porcentagem de células tumorais com coloração citoplasmática e/ou nuclear para a  $\beta$ -catenina. A expressão intratumoral da Wnt-5a correlacionou-se, apenas, com a expressão da  $\beta$ -catenina no estroma, sugerindo a existência da interação tumor-estroma.

Em contraste com os membros Wnt promotores da sinalização canônica, os quais apresentam super expressão em muitos cânceres, dados recente mostraram evidências de que a Wnt-5a, também desempenha papel importante na iniciação e progressão do câncer. Entretanto a exata natureza dessa função ainda é controversa. A função desta proteína, tanto na supressão quanto na promoção do tumor é dependente de fatores intra e extracelulares. A presença de receptores, a interação entre os diferentes tipos celulares e a regulação do gradiente de Wnt-5a pelos componentes da matriz influenciam na complexa rede de sinalização (PUKROP; BINDER, 2008). Uma das teorias vigentes é a de que a Wnt-5a é um ligante representativo que ativa a trajetória independente da  $\beta$ -catenina, durante a

sinalização Wnt. Entretanto, a exata relação entre a trajetória independente da  $\beta$ -catenina e a carcinogênese é desconhecida (HUANG et al., 2005; KURAYOSHI et al., 2006).

## **2.7 $\beta$ -CATENINA E Wnt-5a NO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

Assim como os tumores relatados anteriormente, já foi verificado que no CEC de cabeça e pescoço existe alteração na expressão da  $\beta$ -catenina, onde estudo verificou que a trajetória de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina pode ocasionar o desenvolvimento e a progressão do CEC de cabeça e pescoço promovendo o crescimento invasivo do mesmo, sendo este um achado comum nesse tipo de tumor. Os autores verificaram que na frente de invasão do tumor a  $\beta$ -catenina estava localizada no núcleo e citoplasma (YANG et al., 2006).

Alteração na expressão da  $\beta$ -catenina também está presente em leucoplasia bucal, lesão cancerizável. Estudo verificou diferença da expressão da  $\beta$ -catenina em epitélio normal e em leucoplasia, cujo epitélio exibia ou não displasia epitelial. No epitélio normal, a  $\beta$ -catenina estava presente em membrana plasmática. Em leucoplasias sem a presença de displasia epitelial a expressão da  $\beta$ -catenina foi observada em 24% dos casos na membrana plasmática ou na membrana e no citoplasma celular nas camadas basal e espinhosa. Em leucoplasias com displasia moderada a expressão da  $\beta$ -catenina foi observada em 30% dos núcleos. Quando o padrão histológico exibia quadro de intenso pleomorfismo celular, e grande número de figuras de mitose, incluindo as mitoses atípicas, apresentou padrão de marcação nuclear e a expressão da  $\beta$ -catenina estava presente em mais de 80% das células

epiteliais. Ou seja, a expressão da  $\beta$ -catenina foi estatisticamente dependente do grau de displasia apresentado pelo epitélio bucal (ISHIDA et al., 2007).

Estudo realizado em 118 espécimes de CEC de cabeça e pescoço verificou a perda de expressão da  $\beta$ -catenina da membrana plasmática e a presença de  $\beta$ -catenina no citoplasma celular de alguns tumores analisados. Entretanto, a presença nuclear desta proteína não foi verificada, sendo, para os autores, achado incomum para esse tipo de tumor (RODRIGUEZ-PINILLA et al., 2005).

Yu et al., (2005), estudaram a função da  $\beta$ -catenina em CEC de cabeça e pescoço. Para isso, primariamente, eles estudaram a incidência de mutação da  $\beta$ -catenina em 60 amostras deste tumor. Uma vez que mutações não foram encontradas, eles avaliaram o nível de expressão da proteína  $\beta$ -catenina em amostras de tecido de CEC de orofaringe e correlacionaram essa proteína com o nível de ciclina D1 e os dados clinicopatológicos. Observou-se que pacientes portadores de tumor com baixa expressão de  $\beta$ -catenina tiveram 3,5 vezes mais risco de recorrência local quando comparado com o grupo que possuía alta expressão desta proteína. Os níveis de  $\beta$ -catenina apresentaram tendência em predizer a sobrevida livre de doença. Além disso, foi observada correlação inversa entre os níveis da proteína  $\beta$ -catenina e do FCT e a ciclina D1, indicando que a  $\beta$ -catenina não funciona como molécula de sinalização em CEC de orofaringe. A correlação inversa entre os níveis da  $\beta$ -catenina e da ciclina D1 pode ser explicado pelo efeito oposto que a ativação da trajetória de sinais tem na expressão dessas proteínas.

O CEC da cavidade bucal expressa onze membros dos dezenove existentes da família Wnt (3, 3a, 4, 5a, 5b, 6, 7a, 7b, 10b, 11 e 14), além de grupo de sinais de ativação, sugerindo-se que o aumento da expressão dessas proteínas e de sua

trajetória de sinalização aceleram a progressão do tumor, sendo que esses sinais são predominantemente ativados em células tumorais presentes no front de invasão (URAGUCHI et al., 2004).

A maioria das células bem diferenciadas do CEC de boca apresenta-se com forte expressão para Wnt-1 e para a  $\beta$ -catenina, cuja presença aumenta da camada periférica em direção a parte central do tumor. Para CEC moderadamente e pouco diferenciados observou-se baixa expressão da Wnt-1 e da  $\beta$ -catenina, inclusive na porção invasiva do tumor. Esses dados sugerem que a expressão destas proteínas pode estar relacionada ao grau de diferenciação do CEC (ZHANG et al., 2005).

Taki et al., (2003) avaliaram a expressão dos genes WNT-1, 2, 3, 4, 5a, 6 e 7a, em linhagens celulares de CEC de boca as quais foram comparadas com ceratinócitos normais. Para o estudo foram obtidas linhagens de células provenientes da vulva humana. Onze linhagens celulares do CEC e duas linhagens de ceratinócitos normais foram isoladas e cultivadas. A análise da expressão dos genes WNTs foi realizada através da técnica da PCR. Os autores verificaram relação inversa entre a expressão do WNT-4 e da WNT-5A, ou seja, enquanto algumas linhagens de células não apresentavam expressão para o WNT-4, essas mesmas linhagens de células apresentavam forte expressão para o WNT-5A. Essas linhagens de células apresentaram redução da expressão de E-caderina e elevada expressão da vimentina, acompanhada da expressão do Snail e  $\delta$  EF1, sugerindo a associação do WNT-4 com o fenótipo epitelial e o WNT-5A com o fenótipo mesenquimal das células do CEC. Todas as células do carcinoma com fenótipo epitelial, apresentaram aumento da expressão de ao menos um gene WNT. Esse achado sugere a forte correlação entre a sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina com a formação e progressão do tumor. No CEC as Wnts podem alterar as características

das células como a mobilidade, adesão e invasão como o passo mais tardio da progressão do câncer. Esse estudo sugere que a perda de Wnt-4 e a super expressão da Wnt-5a são possíveis marcadores moleculares para o fenótipo mais invasivo e maligno do CEC.

Mahomed, Altini e Meer (2007), avaliaram a expressão da  $\beta$ -catenina em 30 casos de CEC de boca com e sem metástase nodal, avaliados através de linfonodos extraídos. Pôde-se verificar que houve redução significativa da expressão dessa molécula na membrana plasmática com a progressão do tumor, havendo diferença entre a expressão da proteína em tumores moderadamente e pouco diferenciados quando comparado ao grupo de tumores bem diferenciados. Além disso, os autores observaram acúmulo citoplasmático de  $\beta$ -catenina, com freqüente acentuação paranuclear em mais de 50% das células tumorais na frente de invasão tumoral, os quais foram classificados como moderadamente ou pouco diferenciados.

A redução ou a ausência de marcação da  $\beta$ -catenina na membrana celular é estatisticamente diferente em amostras teciduais de CEC quando comparado com amostra de tecido epitelial normal (WANG, et al 2007), sendo característica correlacionada com o aumento da graduação do modo de invasão, e indicativo de pior prognóstico (CHOW et al., 2001; KUDO et al., 2004; UEDA et al., 2006; MAHOMED; ALTINI; MEER, 2007).

A investigação da expressão da E-caderina e cateninas na membrana plasmática pode ser parâmetro biológico eficiente no prognóstico de metástase dos linfonodos em amostras de tecido biopsiados de CEC de boca (UEDA et al., 2006; MAHOMED; ALTINI; MEER, 2007), o que pode ser novo alvo na inibição da invasão e metástase do CEC, assim como, marcador para o prognóstico de metástase

(BÁNKFALVI et al., 2002; KUDO et al., 2004; FILLIES et al., 2005; MAHOMED; ALTINI; MEER, 2007).

Williams et al., (1998), avaliaram a expressão de caderinas e cateninas durante o processo da carcinogênese bucal, através da análise comparativa do epitélio bucal normal e displásico com o CEC primário e metastático. Eles verificaram que a presença de cateninas com E-caderina nas camadas mais superiores do epitélio reflete a íntima associação com a E-caderina na formação da AJ e que a perda da expressão de cateninas e E-caderina estava relacionada ao grau de malignidade da lesão, concluindo que a perda de caderinas e cateninas na membrana celular na frente de invasão do carcinoma pode ser marcador de metástase.

Bánkfalvi et al., (2002) estudaram o prognóstico e o valor preditivo da expressão imunistoquímica da  $\beta$ -catenina em amostras de tecido tumoral e regiões adjacentes a lesão, sem invasão tumoral e/ou com displasia epitelial de 75 pacientes diagnosticados com CEC de boca. Eles verificaram que em carcinomas invasivos a proteína foi expressa de forma heterogênea. Houve super expressão da  $\beta$ -catenina em doze metástases, oito exibiram pouca expressão e em dez casos não houve diferença no padrão de imunistoquímica de metástase em linfonodo comparado com CEC primário. Os resultados do estudo suportam a hipótese de que a  $\beta$ -catenina está envolvida na manutenção da polaridade e arquitetura do tecido. Sendo que a perda da  $\beta$ -catenina está presente na parte mais invasiva do carcinoma.

Kurtz et al., (2006), correlacionaram a expressão da  $\beta$ -catenina em CEC de cabeça e pescoço de 45 pacientes com outras variáveis clinicopatológicas. Dos casos analisados, trinta e dois tumores encontravam-se localizados na cavidade bucal. Não foi observado relação da baixa expressão da  $\beta$ -catenina na membrana

com a baixa sobrevida quando comparada com os casos de alta expressão dessa proteína. Da mesma forma, não foi encontrada qualquer relação da alta ou baixa expressão dessa proteína com qualquer característica clinicopatológica.

Gao et al., (2005), investigaram a perda de heterozigidade (LOH) e hipermetilação do gene promotor APC e a expressão das proteínas E-caderina e  $\beta$ -catenina, de forma a elucidar a possível função da trajetória da APC/ $\beta$ -catenina em carcinoma bucal. Os autores verificaram padrão de expressão similar entre a E-caderina e  $\beta$ -catenina, as quais foram visualizadas na membrana da célula, na camada basal e parabasal do epitélio normal e também dispersa na membrana e citoplasma das células tumorais em nove das quinze amostras investigadas por imunohistoquímica. A expressão citoplasmática estava presente predominantemente em tumores moderadamente e pouco diferenciados com correlação significativa entre o nível de graduação e o padrão de expressão da E-caderina e  $\beta$ -catenina. Alteração do gene APC foi encontrada ainda em quatro dos nove casos, os quais apresentaram expressão citoplasmática da  $\beta$ -catenina. Sendo assim, o acúmulo da  $\beta$ -catenina citoplasmática pode ser importante na progressão da malignidade a qual foi principalmente, expressa em tumores pouco e moderadamente diferenciados.

De Aguiar, Kowalski e Almeida (2007), avaliaram os possíveis parâmetros clinicopatológicos de marcadores imunohistoquímico entre grupos de pacientes com CEC de boca apresentando recorrência precoce e sem recorrência. Os autores verificaram diferença significativa entre a história de consumo de álcool e os grupos avaliados, com valores de 91,3% no grupo com recorrência e de 63,0% no grupo sem recorrência. A positividade da  $\beta$ -catenina na membrana foi observada em 70,3% do grupo com recorrência do tumor e em 90,7% do grupo sem recorrência. A expressão nuclear da  $\beta$ -catenina não foi verificada. Observou-se a existência de

correlação entre a  $\beta$ -catenina citoplasmática e a invasão linfática. Essa correlação também foi observada em casos tratados com cirurgia e radioterapia, tratamento normalmente dirigido a casos mais avançados. A expressão da  $\beta$ -catenina na membrana foi mais freqüente no grupo sem recorrência do que no grupo com recorrência. Os autores concluíram que a recorrência precoce estava associada ao consumo de álcool e que a expressão da  $\beta$ -catenina na membrana plasmática pode ser considerada como marcador biológico tumoral.

Yeh et al., (2003), avaliaram a correlação entre a expressão protéica e as mudanças epigenéticas e de mutações genéticas relacionados com a trajetória Wnt em CEC de boca de amostras de tecido de trinta pacientes. Nestas amostras foi analisada a mutação da  $\beta$ -catenina em todas as regiões de códons e seqüências de exons–íntrons. Não foram verificadas mutações significativas e apenas três polimorfismos foram encontrados. Em relação à proteína APC verificou-se que as mudanças epigenéticas no CEC ocorrem em estágio pré maligno e que essa mudança não desempenha função no desenvolvimento do câncer. Em relação às proteínas GSK observou-se que o padrão de expressão nuclear e citoplasmática não apresentou relação com mudanças epigenéticas. A ausência de mutações também foi verificada na AXIN–1. Os autores concluíram que a expressão aberrante na trajetória de sinalização do Wnt relacionada as proteínas  $\beta$ -catenina, GSK, APC e AXIN–1, podem não desempenhar função importante no desenvolvimento do CEC.

### **3. PROPOSIÇÃO**

Com base nos dados revistos pela literatura o presente trabalho se propôs a:

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS:**

Avaliar a relação da expressão da  $\beta$ -catenina e da Wnt-5a em CEC de boca com diferentes graus histológicos de malignidade.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Verificar a imunexpressão da proteína Wnt-5a no CEC de boca e a sua relação com a graduação histológica de malignidade tumoral.
2. Verificar a imunexpressão da  $\beta$ -catenina no CEC de boca e a sua relação com a graduação histológica de malignidade tumoral.
3. Verificar a existência da relação entre a imunexpressão das proteínas Wnt-5a e  $\beta$ -catenina em CEC de boca.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA**

A pesquisa desenvolvida foi de prática laboratorial, enquadrada no paradigma quantitativo, com um *design* descritivo correlacional.

### **4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA**

Fizeram parte da amostra os últimos trinta e seis espécimes referentes ao período de 2003 a 2007, com diagnóstico histopatológico de CEC de boca, dos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), Salvador, Bahia. Em seguida os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes foram coletados das fichas do Serviço de Estomatologia da FOUFBA. A coleta dos espécimes e das fichas foi realizada no período de 2006 a 2007.

### **4.3 ASPECTOS ÉTICOS**

A pesquisa desenvolvida foi aprovada pelo Conselho de Ética da Faculdade de Odontologia da UFBA de acordo com a resolução do Comitê de Ética em Pesquisa, e com o número de registro CAAE 008.0.368.000-07 FR 13184.

### 4.3 GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DE MALIGNIDADE

Os blocos de parafina correspondentes às lesões foram recuperados e cortes histológicos de cinco  $\mu\text{m}$  de espessura foram obtidos e processados rotineiramente para a coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E). As lâminas coradas por H/E foram avaliadas por um único examinador, devidamente treinado, e as lesões foram graduadas de acordo com o sistema de graduação proposto pela Organização Mundial de Saúde (WHO), 2005.

Neste sistema, a graduação histológica de malignidade fundamenta-se em critérios morfológicos que representam a população celular tumoral, como, pleomorfismo nuclear e número de mitoses. O grau de queratinização não é consideração fator preponderante como graduação histológica de malignidade.

De acordo com esse sistema, os tumores foram classificados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1: Sistema de graduação histológica de malignidade segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), 2005. Salvador, Bahia, 2008.

Grau Histológico de Malignidade	Aspectos observados
Bem diferenciado	Presença de semelhança ao epitélio escamoso normal.
Moderadamente diferenciado	Presença de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica distintos, incluindo mitoses atípicas e pouca queratinização no tecido.
<b>Pouco diferenciado</b>	Predomínio de células imaturas, com numerosas mitoses típicas e atípicas, além de mínima queratinização.

\*A análise do número de mitoses será realizada em campos pela objetiva de 40 vezes.

#### **4.4 TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA**

Nos mesmos blocos de parafina utilizados para fazer a gradação histológica de malignidade, foram processados cortes de cinco  $\mu\text{m}$  de espessura para a coloração imunoistoquímica. Todos os procedimentos foram realizados nos laboratórios de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), de acordo com a técnica descrita a seguir.

##### **4.5.1 Procedimentos iniciais**

Os cortes histológicos foram estendidos em lâminas carregadas positivamente (Immunoslide, EasyPath) processados pelo método da estreptavidina-biotina (SABC). Todas as lâminas foram armazenadas em estufa a 60°C por no mínimo vinte e quatro horas para melhor fixação do corte. Em seguida, procedeu-se a desparafinização através de duas imersões sucessivas em xilol, sendo a primeira a 60°C por trinta minutos e a segunda em temperatura ambiente por vinte minutos. Após o xilol, os cortes foram reidratados através de três imersões sucessivas em álcool absoluto, seguidas por etanol 95%, 85% e 80% durante cinco minutos cada. Em seguida os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio a 10% e etanol 95% durante dez minutos com a finalidade de remover o pigmento formólico. Posteriormente, realizou-se lavagem em água corrente, seguida por dois banhos em água destilada de cinco minutos cada.

#### **4.5.2 Recuperação antigênica**

O procedimento para a exposição dos sítios antigênicos nos cortes histológicos foi realizada em ácido cítrico (10nM pH 6,0) em banho maria a 95°C durante trinta minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente, seguida por dois banhos em água destilada de cinco minutos cada.

#### **4.5.3 Bloqueio da peroxidase endógena**

O bloqueio da peroxidase endógena foi procedido através de dois banhos de quinze minutos em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 volumes (6%) e metanol (1:1). Os cortes foram lavados, em seguida, em água corrente e duas vezes em água destilada. Logo após realizou-se tamponamento com três banhos de cinco minutos em solução de TRIS, pH 7,4.

#### **4.5.4 Incubação dos anticorpos primários, secundário, do anticorpo terciário e do cromógeno**

Após a lavagem das lâminas com tampão TRIS e remoção do excesso de líquido, foram aplicadas alíquotas de anticorpos primários diluídos em solução de TRIS, pH 7,4 acrescido de albumina bovina a 1%, contendo azida sódica a 0,1% (BSA – Biotest S/A – São Paulo, Brasil), cujas concentrações e tempos de incubação seguem na Tabela 2 abaixo. Para o anticorpo Wnt-5a, foi realizado previamente bloqueio de sítios inespecíficos utilizando o produto Swine Serum (X0912, DAKO, Glostrup, Denmark) por 40 minutos.

Tabela 2 – Distribuição das concentrações, procedência, clone e tempos de incubação dos anticorpos utilizados. Salvador, Bahia, 2008.

<b>Soro</b>	<b>Tipo</b>	<b>Concentração</b>	<b>Procedência</b>	<b>Clones</b>	<b>Incubação</b>
anti-Wnt-5a	Monoclonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology	C-16	18 horas
anti- $\beta$ -catenina	Monoclonal	1:150	BD Transduction Laboratories	14	18 horas

Após a incubação com o anticorpo primário, seguiu-se ao tamponamento com dois banhos em TRIS pH 7,4. As etapas seguintes foram realizadas automaticamente, com o auxílio do sistema de coloração universal Dako Cytomation Autostainer (DAKO Corporation, Glostrup, Denmark). Após serem acomodadas no equipamento, as lâminas contendo os cortes foram submetidas a duas novas lavagens com TRIS de cinco minutos cada e então encubação com anticorpo secundário biotilado (K0690, *Biotinylated Link Universal, LSAB + System-HRP*, DAKO, Glostrup, Denmark) por trinta minutos, seguida por lavagens com TRIS, e encubação com o complexo Streptavidina-Peroxidase (K0690, *Streptavidin-HRP, LSAB + System-HRP*, DAKO, Glostrup, Denmark) por trinta minutos.

Para revelação utilizou-se o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina, K3468; DAKO, Glostrup, Denmark) com encubação de dez minutos. Posteriormente os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer por dez minutos, e lavado em duas passagens de água destilada. As lâminas foram retiradas do equipamento e processadas manualmente. Os cortes foram desidratados em cadeias ascendente de etanóis nas concentrações (%) de 50, 60, 70, 80, 90, 95, absoluto (1), absoluto (2), absoluto (3), diafinizados em dois banhos de xilol e montados em resina Permunt (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) para exame de microscópio de luz.

Para cada anticorpo primário avaliado, foram utilizados cortes para controle positivo e controle negativo. Como controle positivo das reações, utilizou-se

amostras imunoreativas da área peri-lesional do material sem invasão tumoral. Para o controle negativo foram utilizados os mesmos tecidos do controle positivo, porém com a substituição da alíquota do anticorpo primário por alíquota de tampão TRIS-HCL. Os controles positivos e negativos foram incubados juntamente com os grupos experimentais, durante o período de 40 minutos.

#### **4.6 ANÁLISE DA MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA**

A análise quantitativa das proteínas estudadas foi executada por um único observador, sendo realizada da seguinte forma:

Para a avaliação da expressão da proteína Wnt-5a foram selecionados campos, dentro de cada zona analisada, e células tumorais foram contabilizadas da esquerda para a direita da lâmina, de baixo para cima até que fossem totalizadas 1000 células. Para fins de análises estatísticas, a expressão imunoistoquímica foi considerada em relação ao percentual absoluto de células positivas aos antígenos pesquisados e também semi-quantitativamente de acordo com os escores: (1) menos de 10% das células marcadas, (2) de 10% a 35% das células marcadas, (3) de 35% a 70% das células marcadas e (4) mais de 70% das células marcadas.

Além disso foi observado o padrão de imunomarcção da Wnt-5a onde foi considerada (1) marcação predominantemente citoplasmática, quando a imunoreatividade estava presente no citoplasma e em menos de 10% do núcleo; (2) marcação nuclear/citoplasmática, quando a imunoreatividade estava presente em proporções semelhantes do citoplasma e núcleo e (3) predominantemente nuclear, quando a imunoreatividade estava presente no núcleo das células e em menos de 10% do citoplasma. A intensidade de marcação também foi avaliada de acordo com

sistema adotado por Jönsson, et al (2002), onde foi considerada (1) marcação leve (+; <30%); (2) marcação média (++; 30-75%) e (3) marcação alta ou intensa (+++; >75%).

Para proteína  $\beta$ -catenina foi avaliada de acordo com a classificação do padrão de imunomarcação adotado por Kotsinas et al., (2002) onde foi considerado (1) Padrão membranoso, quando a imunoreatividade estava presente apenas na membrana celular; (2) Padrão membranoso/citoplasmático, quando a imunoreatividade estava presente no citoplasma e na membrana celular; (3) Padrão citoplasmático, quando a imunoreatividade estava presente predominantemente no citoplasma e em menos de 20% dos núcleos celulares marcados e (4) Padrão nuclear, quando a imunoreatividade estava presente no citoplasma e concomitantemente em mais de 20% do núcleo celular.

Foi considerada marcação de coloração acastanhada sem levar em conta a diferença de intensidade da cor. Para a avaliação e quantificação das marcações positivas de cada anticorpo, foi utilizado microscópio de luz (Zeiss-Axiolab) na objetiva de 40x, acoplado à uma máquina (Samsung). O referido microscópio era acoplado ao programa de computador IMAGELAB - (Sistema de Processamento e Análise de Imagem).

#### **4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram tabulados calculando-se as medidas descritivas (média e desvio padrão). A comparação entre os grupos foi realizada pelo método da ANOVA e pelo Teste Tukey (minitab®). O valor de "p" considerado foi  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Através dos dados obtidos, pôde-se verificar, na análise descritiva, que no estudo em questão, em relação a amostra estudada (36), 33,33% (12/36) pacientes eram do sexo feminino e 66,67% (24/36) do sexo masculino, com idade variando da quarta a nona década de vida (média 60 anos). Em relação aos hábitos, das fichas clínicas que apresentavam este dado verificamos que 84,61% (22/26) dos pacientes diziam ser tabagistas e 65,38% (17/26) relataram o uso de álcool. A associação dos hábitos foi verificada em 53,84% (14/26) da amostra. A história de câncer na família foi verificada em 11,11% (4/36). A avaliação dos hábitos e da história de câncer na família não pôde ser verificada na totalidade da amostra, uma vez que a ficha de anamnese de alguns pacientes encontrava-se incompleta (tabela 3).

De acordo com as localizações encontradas, pôde-se verificar que houve maior predominância em língua 38,89% (14/36), seguida de palato 25,00% (9/36), assoalho bucal 16,67% (6/36) e rebordo alveolar inferior 8,33% (3/36) (tabela 3). A ocorrência da mesma lesão em dois sítios diferentes foi verificada em um caso (2,78%) que se relacionou a lesão em palato duro e ventre de língua, porém somente a localização em palato duro foi incluída nesta amostra pelo fato da lesão em ventre de língua ter dado o diagnóstico de carcinoma *in situ*.

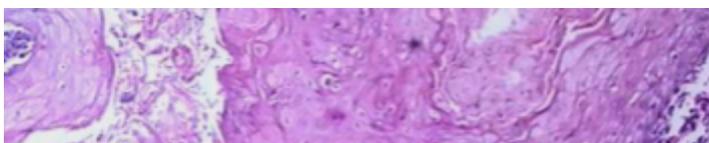
Tabela 3 – Distribuição dos casos de CEC de boca segundo gênero, faixa etária, localização primária e hábitos. Salvador, Bahia, 2008.

<b>Gênero</b>	<b>Número de pacientes</b>	<b>%</b>
Masculino	24	66,67
Feminino	12	33,33
Total	36	100
<b>Faixa etária</b>		
30 – 45	3	8,33
46 – 61	19	52,78
62 – 77	9	25,00
78 – 93	3	8,33
Sem informação	2	5,56
Total	36	100
<b>Localização primária</b>		
Palato	9	25,55
Assoalho bucal	6	16,67
Rebordo alveolar inferior	3	8,33
Língua	14	38,89
Região retromolar	1	2,78
Mucosa jugal	1	2,78
Lábio inferior	2	5,56
<b>Total</b>	<b>36</b>	<b>100</b>
<b>Tabagistas</b>		
Sim	22	61,11
Não	4	11,11
Sem informação	10	27,78
Total	36	100
<b>Etilistas</b>		
Sim	17	47,22
Não	9	25,00
Sem informação	10	27,78
Total	36	100

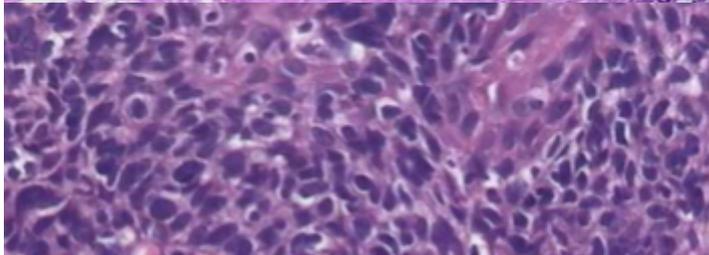
## 5.2 GHM

De acordo com a classificação de graduação histológica de malignidade proposta pela WHO (2005), o CEC de boca mais predominante foi o tipo

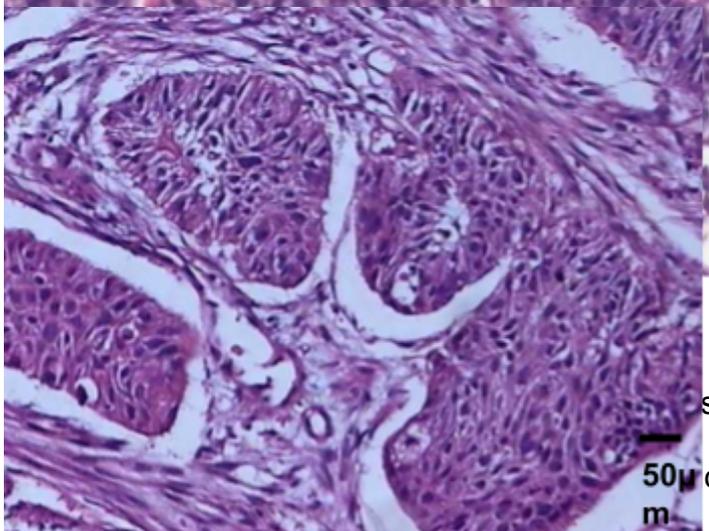
moderadamente diferenciado 75,00% (27/36), seguido do pouco diferenciado 16,67% (6/36) e do bem diferenciado 8,33% (3/36) (figuras 1, 2 e 3).



do. Observa-se queratinização expressiva  
ador, Bahia, 2008.



erenciado. Observam-se grupamentos de  
ulares invadindo o tecido. (H/E). Salvador,



Observam-se ilhas tumorais invadindo o  
pleomórficas. Nota-se ainda ausência de  
noral. (H/E). Salvador, Bahia, 2008.

significante quando comparada a  
50  $\mu$  m  
m  
ológica de malignidade ( $p < 0,005$ ).

Verificou-se que a maioria das lesões foi classificada como moderadamente diferenciada, independente da região acometida. Dos quatorze casos situados em língua 78,57%, foram moderadamente diferenciados. Nas demais localizações esse tipo de diferenciação foi encontrado em palato 77,77% (7/9), assoalho bucal 83,33% (5/6), rebordo alveolar inferior 100% (3/3). A mesma relação não foi verificada na região de lábio inferior, onde as lesões foram classificadas como bem diferenciadas (tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição das lesões de acordo com sua localização e graduação histológica de malignidade (GHM). Salvador, Bahia, 2008.

Localização / GHM	Bem diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pouco diferenciado
Palato	1	7	1
Assoalho bucal	0	5	1
Rebordo alveolar	0	3	0
Língua	0	11	3
Região retromolar	0	0	1
Mucosa jugal	0	1	0
Lábio inferior	2	0	0
Total	3	27	6

#### 5.4 IMUNOEXPRESSÃO DA $\beta$ -CATENINA

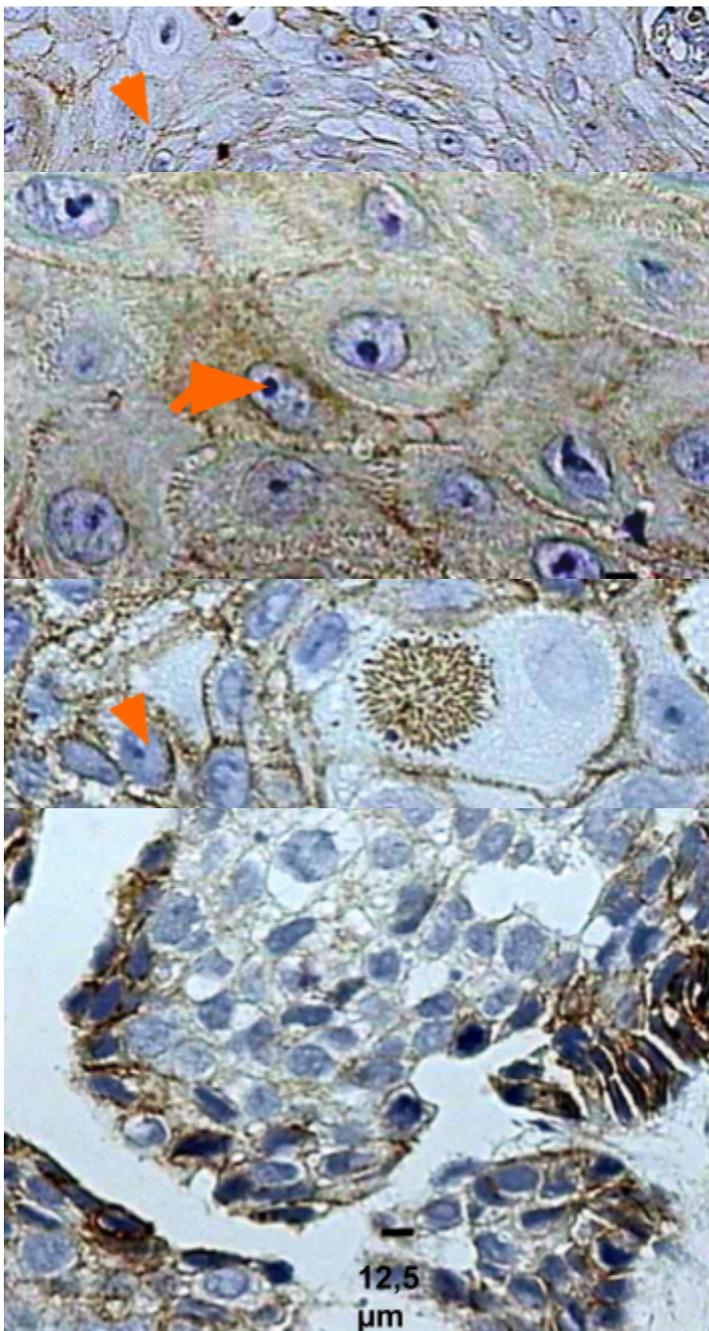
Para a análise da marcação da  $\beta$ -catenina, considerou-se positiva, as células que apresentavam marcação acastanhada. Na análise descritiva, observou-se pequena expressão da  $\beta$ -catenina em membrana plasmática, sendo sua maior expressão em citoplasma e núcleo. Foi verificado que em 75,00% (27/36) das amostras predominou o padrão citoplasmático cuja imunoexpressão estava presente no citoplasma e em menos de 20% do núcleo da célula, e em 25,00% (9/36) das amostras predominou o padrão membranosos/citoplasmático, no qual a imunomarcação esteve presente tanto na membrana plasmática quanto no citoplasma. Os outros padrões de marcação, membranosos e nuclear, não foram observados.

## 5.5 IMUNOEXPRESSÃO DA $\beta$ -CATENINA E GHM

Através da análise das amostras, verificou-se que houve tendência a redução da expressão da  $\beta$ -catenina na membrana plasmática e aumento de sua concentração no citoplasma e núcleo com a perda de diferenciação tumoral (figuras 4 a e b, 5 e 6). Quando avaliado o nível de expressão da  $\beta$ -catenina nos CEC pouco diferenciados, 16,67% (6/36), constatou-se diminuição da imunomarcagem desta proteína em relação aos tumores moderadamente e bem diferenciados. Esta redução de expressão foi acentuada na localização da membrana plasmática. Nesses tumores, o padrão de marcação verificado foi eminentemente citoplasmático 83,33% (5/6). Em apenas um caso verificou-se o padrão membranoso/citoplasmático, entretanto nesse tumor específico, a marcação foi muito reduzida, sendo que a maioria das células não apresentou expressão para a  $\beta$ -catenina. Em relação aos três tumores classificados como bem diferenciados, observou-se que todos os casos apresentaram maior expressão da  $\beta$ -catenina na membrana quando comparado aos CECs pouco diferenciados. Dos casos bem diferenciados, dois apresentaram padrão membranoso citoplasmático e um caso o padrão citoplasmático. Neste caso, a presença da proteína no núcleo foi pouco expressiva em relação aos tumores pouco diferenciados (Tabela 5). Apesar disso, na análise estatística, não houve correlação significativa entre a imunomarcagem da  $\beta$ -catenina e a graduação histológica de malignidade ( $p=0,13$ ).

Tabela 5 – Distribuição do tumor segundo a graduação histológica de malignidade e o padrão de coloração da  $\beta$ -catenina. Salvador, Bahia, 2008.

<i>GHM / Padrão de coloração <math>\beta</math>-catenina</i>	<i>Membranoso – citoplasmático</i>	<i>Citoplasmático</i>
Bem diferenciado	2	1
Moderadamente diferenciado	6	21
Pouco diferenciado	1	5
Total	9	27



ciado. Observa-se a imunoeexpressão da células tumorais é possível verificar ainda a idina-biotina peroxidase. Salvador-Bahia,

ciado, onde se verifica, a imunomarcção pretanto a presença de maior número de ça de imunomarcção nuclear da proteína oxidase. Salvador, Bahia, 2008.

ado, verifica-se, ausência ou mínima a. A expressão desta proteína é mais Verifica-se que nesta região a marcação peroxidase. Salvador, Bahia, 2008.

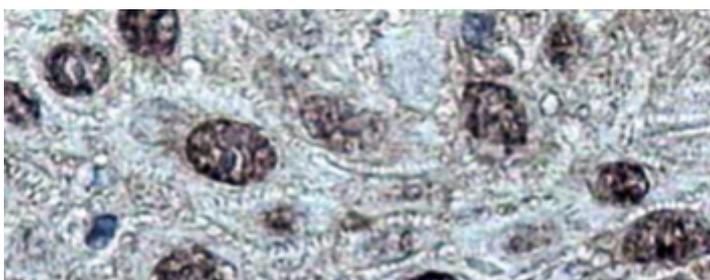
### **COLORAÇÃO DA $\beta$ -CATENINA**

or e o padrão de coloração da  $\beta$ -catenina, observou-se que 66,66% (6/9) das lesões em palato, 83,33% (5/6) das lesões em assoalho bucal, 100% (3/3) das lesões em rebordo alveolar inferior e 71,42% (10/14) das lesões em língua apresentaram padrão citoplasmático. Entretanto, a análise estatística não foi significativa.

### **5.7 IMUNOEXPRESSÃO DA Wnt-5a**

Para a análise da proteína Wnt-5a, considerou-se positivas, as células que apresentavam coloração acastanhada. A expressão da proteína Wnt-5a estava presente exclusivamente em citoplasma e núcleo (figuras 7, 8 e 9). Em relação ao percentual de células marcadas, observou-se que, 14,00% (5/36) da amostra apresentaram de 35% a 70% e 86,00% (31/36) da amostra exibiram mais de 70%. E esta marcação encontrava-se distribuída da seguinte forma: 36,11% (13/36) da amostra apresentaram padrão predominantemente citoplasmático e 61,11% (22/36) apresentaram padrão nuclear/citoplasmático e um caso (2,72%) apresentou o padrão predominantemente nuclear. A marcação da Wnt-5a não foi verificada em membrana plasmática. No padrão predominantemente citoplasmático, foi verificada marcação nuclear, entretanto sua expressão foi inferior a 10% das células contadas.

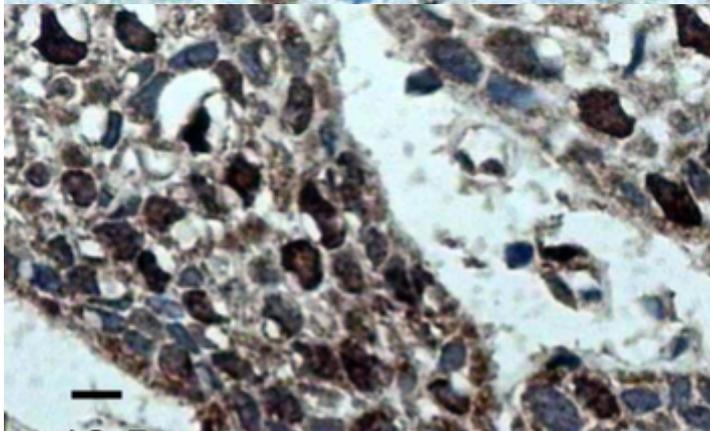
Ainda em relação a esse padrão, foi verificado que a intensidade de marcação variava entre os casos. Constatou-se que 27,78% (10/36) apresentaram baixa intensidade, 47,22% (17/36) apresentaram média intensidade e 25,00% (9/36) apresentaram alta intensidade.



ciado. Observa-se, na área, padrão de baixa intensidade da proteína Wnt-5a. Streptavidina-biotina



erenciado. Observa-se, na área, padrão de marcação moderada da proteína Wnt-5a.



observa-se, na área, padrão de expressão de alta intensidade da proteína Wnt-5a. Streptavidina-biotina

## **5.8 PADRÃO DE MARCAÇÃO E INTENSIDADE DE MARCAÇÃO DA Wnt-5a E GHM**

Em relação ao padrão de expressão da Wnt-5a e a graduação histológica de malignidade, não foi observado correlação estatística significativa ( $p=0,41$ ). A maioria dos tumores, independente do seu grau de diferenciação apresentou padrão nuclear/citoplasmático: 100% (3/3) dos tumores bem diferenciados, 55,55% (15/27) dos tumores moderadamente diferenciados e 66,67% (4/6) dos tumores pouco diferenciados. O padrão predominantemente citoplasmático só foi verificado em 40,74% (11/27) dos tumores moderadamente diferenciados e 33,33% (2/6) dos pouco diferenciados.

Com referência a intensidade de marcação do tumor pela proteína, constatou-se que dos tumores bem diferenciados (03), dois exibiram alta intensidade e um tumor média intensidade. Nos tumores moderadamente diferenciados, verificou-se que 48,14% (13/27) apresentaram média intensidade e 33,33% (9/27) baixa intensidade. Dentre os tumores pouco diferenciados (6), 50% (3/6) apresentaram média intensidade e apenas um tumor apresentou baixa intensidade. Na análise estatística, verificou-se que não houve correlação significativa entre a intensidade e a graduação histológica de malignidade ( $p= 0,41$ ).

## **5.9 PERCENTUAL DE CÉLULAS MARCADAS E INTENSIDADE DE MARCAÇÃO DA Wnt-5a**

Com referência a esse tópico, verificou-se que os tumores cujas células expressaram a Wnt-5a em baixa intensidade foram os que apresentaram menores

médias percentuais de células marcadas e esta relação foi estatisticamente significativa ( $p=0,000$ ). Porém, nos grupos que apresentaram média ou alta intensidade, a estatística não revelou diferenças entre esses dois grupos avaliados, pois em ambos o percentual de células marcadas foi expressivo. Portanto, o que se verificou foi que a menor intensidade da Wnt-5a está associada a expressão em pequeno número de células.

#### **5.10 IMUNOEXPRESSÃO DA Wnt – 5a E A LOCALIZAÇÃO DO TUMOR**

Ao avaliar a média do percentual de células marcadas para Wnt-5a com a localização do tumor, verificou-se diferença estatística significativa entre a localização de palato com as de assoalho bucal, rebordo alveolar inferior e língua ( $p=0,004$ ). Entre as demais localizações não foi observada diferença estatística significativa. Dentre as médias do percentual de células marcadas, verificou-se que as regiões de assoalho bucal e rebordo alveolar inferior foram as que obtiveram menor média deste percentual.

Em relação a intensidade dessa proteína com a localização do tumor, não foi verificada relação estatística significativa ( $p<0,05$ ). A maioria dos CEC de boca, segundo a localização, apresentou intensidade média (47,22%-17/36), enquanto a maioria do CEC localizado em assoalho bucal exibiu intensidade baixa (66,67%-4/6).

#### **5.11 IMUNOEXPRESSÃO DA $\beta$ -CATENINA E A IMUNOEXPRESSÃO DA Wnt-5a**

Quando avaliado a imunexpressão da  $\beta$ -catenina com a imunexpressão da Wnt-5a, observou-se que não houve relação estatística significativa entre a média do percentual de células marcadas da Wnt-5a com o padrão de imunomarcção da  $\beta$ -catenina membranosos/citoplasmático e o citoplasmático ( $p= 0,196$ ).

Em relação ao padrão da  $\beta$ -catenina com a intensidade da Wnt-5a, observou-se que a maioria, tanto o padrão membranosos/citoplasmático quanto o padrão citoplasmático da  $\beta$ -catenina, apresentaram intensidade média para Wnt-5a, 66,67% (6/9) e 40,74% (11/27), respectivamente. Entretanto, a correlação estatística não foi significativa ( $p= 0,333$ ).

Quando comparado o padrão de expressão da Wnt-5a com o da  $\beta$ -catenina, percebeu-se que tanto o padrão membranosos/citoplasmático quanto o padrão citoplasmático da  $\beta$ -catenina, em sua maioria, apresentaram padrão nuclear citoplasmático para a Wnt-5a, 77,78% (7/9) e 55,55% (15/27), respectivamente. Essa relação também não foi estatisticamente significativa ( $p= 0,18$ ).

## **6. DISCUSSÃO**

O CCP é representado na sua maioria pelo carcinoma escamocelular (CEC), que acomete as vias aereodigestivas superiores, e está entre os seis tipos de câncer mais prevalentes no sexo masculino e entre os oito no sexo feminino (DEDIVITIS, et al., 2004). Diversas pesquisas são desenvolvidas a respeito do câncer bucal, em especial ao CEC, tanto na questão epidemiológica, quanto na sua base biológica. Isso se deve, possivelmente, a sua expressiva representatividade na população mundial (KIM et al., 2003; DURAZZO et al., 2005).

A amostra analisada no presente estudo foi selecionada de forma aleatória, independente dos fatores gênero, idade e localização da lesão. Neste estudo em questão, houve a predominância por indivíduos do gênero masculino, numa razão de 1,8:1. A predileção por esse gênero é amplamente consagrada na literatura (VEECK et al., 1992; CARVALHO et al., 2001; GERVÁSIO et al., 2001; AMORIM; AMORIM; FREITAS, 2002; PERUSSI et al., 2002; KIM et al., 2003; DEDIVITIS, et al., 2004; DURAZZO et al., 2005). Entretanto, estudos mais recentes já demonstram forte tendência para a equiparação entre os gêneros, quando se trata do CEC de boca, uma vez que existem relatos de que a incidência desta lesão em mulheres vem crescendo gradativamente. Acredita-se que esse achado esteja relacionado ao fato das mulheres, atualmente, desempenharem hábitos semelhantes aos dos homens na sociedade, principalmente quando a esses hábitos associa-se o uso de tabaco e álcool (DURAZZO et al., 2005; CHANDU; ADAMS; SMITH, 2005).

Neste estudo, a idade dos indivíduos variou de 44 a 91 anos, em uma média de 60 anos, dado esse semelhante ao encontrado na literatura, onde a faixa etária mais acometida compreende entre a quinta e sexta década de vida (VEECK et al., 1992; CARVALHO et al., 2001; GERVÁSIO et al., 2001; AMORIM; AMORIM; FREITAS, 2002; PERUSSI et al., 2002; KIM et al., 2003; DEDIVITIS, et al., 2004; CHANDU; ADAMS; SMITH, 2005). Entretanto, sabe-se que existe uma tendência do CEC de boca não acometer apenas indivíduos mais velhos. Indivíduos jovens com idade inferior a 35 anos que desenvolvem o CEC de boca também podem ser acometidos, desde que ocorra a presença de fatores etiológicos (IYPE, 2004). Llewellyn, Johnson e Warnakulasuriya (2004) verificaram a incidência de CEC de boca em indivíduos com idade igual ou inferior a 45 anos, onde apenas 25% dos homens e 40% das mulheres nunca haviam fumado. Em relação ao etilismo, 88%

dos homens e 68% das mulheres consumiam álcool com regularidade. A associação entre os dois hábitos foi verificada em 50% dos homens e 32% das mulheres. Concluiu-se, portanto, que os fatores de risco do câncer bucal são os mesmos para indivíduos jovens e de idade mais avançada. No nosso estudo, dentre as fichas que apresentavam a idade do paciente, observou-se a presença de apenas três indivíduos com idade igual ou inferior a 45 anos. Desses, a associação dos dois hábitos foi verificada em um paciente, assim como o uso apenas do álcool. Os dados da anamnese do outro paciente estavam incompletos.

O perfil tradicional do paciente com CEC de boca na nossa amostra, constou de 84,61% de tabagistas e 65,38% de etilistas. Desses, 53,84% afirmaram a associação de hábitos. Esse achado do perfil epidemiológico é unânime entre os estudiosos do CEC de boca (VEECK et al., 1992; CARVALHO et al., 2001; GERVÁSIO et al., 2001; AMORIM; AMORIM; FREITAS, 2002; PERUSSI et al., 2002; KIM et al, 2003; DEDIVITIS, et al., 2004; DURAZZO et al., 2005). Apenas um indivíduo do nosso estudo negou o uso do tabaco e álcool e, possivelmente, até mesmo pela idade do paciente, 91 anos, a causa do câncer tenha sido provocada por outros fatores, como idade e até mesmo a genética, já que o mesmo apresentava história de câncer na família. Esse dado, por sua vez, foi encontrado em apenas 16% da amostra.

Entre os sítios anatômicos intra bucais associados ao CEC encontram-se a base de língua, e o assoalho da cavidade bucal, não existindo, na literatura, predileção especificamente rigorosa (VEECK et al., 1992; CARVALHO et al., 2001; GERVÁSIO et al., 2001; AMORIM; AMORIM; FREITAS, 2002; PERUSSI et al., 2002; KIM et al., 2003; LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2004; DURAZZO et al., 2005; BELL et al., 2007). No nosso estudo, a localização predominante foi a

língua (38,89%) seguida do palato (25,00%) e assoalho da cavidade bucal (16,67%). A ocorrência da mesma lesão em dois sítios diferentes foi verificada em quatro dos trinta e seis tumores avaliados (11,11%). Desses, apenas um caso (25%) apresentou localizações distintas das lesões, sendo o palato e ventre de língua, podendo, dessa forma, se considerar que o paciente tinha dois tumores primários. Nos três casos restantes (75%), os sítios anatômicos foram considerados contíguos. Entretanto, é possível a ocorrência de dificuldade quanto à localização da lesão, uma vez que no momento em que os pacientes chegaram ao Serviço, as lesões já apresentavam padrão T3 ou T4, nas quais existe o envolvimento de mais de um sítio anatômico por contigüidade. Ou seja não podemos afirmar se as lesões eram entidades distintas, e para fim de diagnóstico é usual a escolha do sítio onde o profissional terá melhor acesso, fora da área de necrose.

Participaram da amostra dois casos de CEC na região de lábio. Acreditamos que o tumor nessa localização não apresenta a mesma agressividade e nem os mesmos fatores etiológicos de CEC intra bucais. Em se tratando de CEC em lábio, o fator etiológico mais importante é a exposição solar. Inclusive, desses casos, apenas um paciente possuía a ficha completa e nela constava que o mesmo, apesar de ser tabagista, apresentava como atividade o trabalho rural (DE VISSHER et al., 1998; VENESS et al., 2001). Entretanto, na literatura estudada de pesquisas envolvendo o CEC de boca, houve uma significativa parcela de autores que incluíram essa localidade, já que o tipo histológico foi o mesmo (GONZALEZ–MOLES et al., 1996; COSTA et al., 2005; GUERRA et al., 2005; CHANDU, ADAMS; SMITH, 2005).

Apesar dos avanços tecnológicos como a descoberta e aperfeiçoamento de terapias alternativas para o tratamento do câncer (SCULLY; BAGAN, 2007), o prognóstico para o CEC de boca continua sombrio, uma vez que sua base molecular

ainda não é muito bem compreendida e envolve múltiplos eventos genéticos que culminam na carcinogênese, incluindo a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor (WILLIAMS, 2000; BELL et al., 2007). Estima-se que a sobrevida seja de 40% no primeiro ano reduzindo para 10% no quinto ano (PERUSSI et al., 2002).

Diversas teorias têm sido postuladas para explicar as diferenças de sobrevida entre os indivíduos. Dentre elas incluem-se as diferenças na predisposição genética, a diferença no tratamento oferecido e aceitado pelo paciente, acesso ao serviço de saúde, a condição sócio-econômico, a apresentação e comportamento da lesão no momento do diagnóstico e as diferentes exposições aos fatores de risco associado (NICHOLS; BHATTACHARYYA, 2007).

Estudo realizado nos Estados Unidos e no Brasil apontaram para a diferença de comportamento do câncer de boca em indivíduos da cor negra e/ou parda em relação aos indivíduos brancos (NICHOLS; BHATTACHARYYA, 2007; GÓES, 2007). Assim como os autores, acreditamos que esse possa ser um fator a ser considerado, e que, nestes países, ainda existem diferenças alarmantes entre essas raças no quesito sócio-econômico. A característica da população negra norte americana é de indivíduos moradores dos subúrbios, com baixa escolaridade e dificuldade a assistência médica. No Brasil, encontramos quadro semelhante ou até mesmo mais agravante, uma vez que a política de nosso governo caracteriza-se por pobre investimento na educação fundamental e no sistema de saúde pública. Apesar de não ter sido objetivo do nosso estudo, de fato, a amostra estudada consta de indivíduos pardos com baixo grau de escolaridade e baixa renda mensal.

Da mesma forma, o estudo em questão não teve como objetivo avaliar a sobrevida dos pacientes da amostra, inclusive porque o nosso acesso foi apenas

aos arquivos de anatomia patológica e as fichas clínico-anamnésicas, além de que o Serviço de Estomatologia da UFBA após diagnosticar a lesão, encaminha o paciente ao serviço de oncologia hospitalar. Nesta etapa, infelizmente, perdemos o contato com a quase totalidade desses pacientes, seja pela debilitação provocada pela doença e seu tratamento, seja por se tratar de uma comunidade extremamente carente de cuja condição econômica impossibilita seu acesso ao nosso serviço para acompanhamento.

Talvez, como conseqüência, uma das dificuldades encontrada nesse estudo, foi o fato de encontrarmos ficha de exame anamnésico preenchida de forma incompleta, ressaltando a importância da necessidade de maior atenção dos cirurgiões-dentistas no preenchimento da ficha de biópsia a fim de contribuir com as pesquisas básicas.

Diversos autores vêm buscando, incessantemente, por sistemas de estadiamento clínico e graduação histológica de neoplasias malignas que têm como objetivo fornecer informações para o estabelecimento da terapêutica mais adequada a cada indivíduo, assim como auxiliar na predição do curso clínico da doença (RIPPEY, 1998). Para o estudo em questão, apesar dos inúmeros sistemas de graduação histológica de malignidade existentes, optamos pela utilização do sistema proposto pela WHO (2005), uma vez que, na bibliografia consultada, ele foi o mais utilizado. A maioria dos tumores foi graduada como moderadamente diferenciado (75,00%). Esse achado, inclusive, é percebido pela própria WHO (2005), como o mais prevalente sendo, também, bastante comum na literatura (YU et al., 2005; BELL et al., 2007).

A utilização de peças obtidas através de biópsias incisórias para avaliação histológica pode prover informação adicional com referência à atividade biológica do

tumor através do uso de marcadores biológicos que visam o prognóstico do comportamento e agressividade do tumor no estágio da biópsia, o que capacitará o médico especializado a escolher terapias específicas a cada paciente (KADEMANI et al., 2005).

A biologia molecular moderna tem demonstrado a invasão e metástase do tumor como processo contínuo que incluem três etapas: a redução da adesão intercelular, alteração na interação das células tumorais com a matriz extracelular e a invasão dentro e ao redor dos tecidos, incluindo os vasos sanguíneos e os vasos linfáticos (LIN et al., 2004).

Para a avaliação do comportamento da amostra estudada, optamos pela avaliação das proteínas  $\beta$ -catenina e Wnt-5a, por se tratarem de marcadores promissores no que se refere à predição do comportamento biológico dos tumores.

A adesão intercelular é responsável pela morfogênese da célula e do tecido, e pela regulação dos processos celulares de motilidade, crescimento, diferenciação e sobrevivência. A AJ, é o tipo de adesão intercelular mais comum sendo importante para a manutenção da arquitetura e polaridade celular, além de poder limitar o movimento e proliferação da célula (BEN-ZE'EV; GEIGER, 1998; NAGAFUCHI, 2001).

Em relação à  $\beta$ -catenina, observamos pequena expressão em membrana plasmática, sendo sua maior expressão em citoplasma e núcleo. As lesões apresentaram o perfil de apenas dois padrões de marcação: o padrão citoplasmático com a imunexpressão presente no citoplasma e em menos de 20% do núcleo da célula (75,00%) e o padrão membranosos/citoplasmático, no qual a imunomarcação esteve presente tanto na membrana plasmática quanto no citoplasma (25,00%).

A perda da AJ na adesão normal entre as células associada à desregulação de outras trajetórias de sinalização as quais podem contribuir para o aumento da

migração e proliferação das células tumorais, levando a invasão e metástase (SMITH; PIGNATELLI, 1997; CONACCI-SORRELL; ZHURINSKY; BEN-ZE'EV, 2002). A desregulação do complexo caderina/catenina, além da redução da expressão da  $\beta$ -catenina, está presente em vários tipos de malignidade, principalmente as de caráter mais agressivo e com maior potencial de metástase (BARTH; NÄTHKE; NELSON, 1997; BEAVON, 2000). Dessa forma, as cateninas e os complexos intracelulares a ela associados são peças fundamentais para a patogênese e progressão dos tumores malignos (FILLIES et al., 2005).

Quando avaliado o nível de expressão da  $\beta$ -catenina nos CEC pouco diferenciados (16,67%), constatou-se baixa expressão da proteína, inclusive em membrana plasmática. Desses tumores o padrão de marcação predominante da proteína foi o citoplasmático com menos de 20% de expressão em núcleo (83,33%). Em apenas um caso se verificou o padrão membranosos/citoplasmático, entretanto nesse tumor específico a maioria das células não apresentava expressão para a  $\beta$ -catenina. Observou-se ainda que em alguns tumores houve tendência de predomínio de marcação para a proteína nas células localizadas na periferia da ilha tumoral. Já em relação aos três tumores classificados como bem diferenciados, observou-se que todos os casos apresentaram maior expressão da  $\beta$ -catenina na membrana quando comparado ao CEC pouco diferenciado, sendo a presença da proteína no núcleo pouco expressiva em relação aos tumores pouco diferenciados. Nesse estudo apesar do pequeno número da amostra, pode-se sugerir que a perda de diferenciação do tumor reflete-se em menor expressão da  $\beta$ -catenina na membrana, e aumento de sua concentração no núcleo e citoplasma da célula. Observamos ainda, que não houve relação direta entre o menor grau de diferenciação do tumor e a expressão em núcleo maior que 20% das células da

população tumoral, talvez como já dissemos anteriormente, isso possa ser atribuído ao pequeno número de casos pouco diferenciados.

A literatura apresenta diversos estudos que associam a redução da expressão da  $\beta$ -catenina em membrana plasmática com a perda de diferenciação do tumor. A possível razão para esse achado é o fato do tumor mais diferenciado, por ser menos invasivo, pode apresentar maior adesividade entre as células (WIJNHOVEN; DINJENS; PIGNATELLI, 2000; HIROHASHI; KANAI, 2003). Essa característica já foi verificada em tumores como o CEC de esôfago (LOPEZ-GONZALEZ et al., 2004; NINOMIYA et al., 2000; LIN et al., 2004), o CEC de cabeça e pescoço (RODRIGUEZ-PINILLA et al., 2005; YU et al., 2005), e até mesmo em displasias epiteliais (ISHIDA et al., 2007).

Diferença de recorrência local foi verificada em pacientes portadores de tumor com baixa expressão de  $\beta$ -catenina os quais tiveram 3,5 vezes mais risco do que àqueles que possuíam alta expressão desta proteína. Dessa forma, é possível que os níveis de  $\beta$ -catenina apresentem tendência em prever, também, a sobrevida livre de doença (YU et al., 2005).

Ao contrário da expressão da  $\beta$ -catenina em membrana, em se tratando de sua localização nuclear, existem divergências na literatura quanto as prováveis causas de sua expressão. E quando presente, não existe consenso do responsável por essa expressão: se é ocasionada pela mutação da própria proteína ou se é ocasionada por outros fatores, como por exemplo, a trajetória de sinalização. Pesquisa realizada em carcinoma seroso de ovário, observou correlação estatística significativa entre a localização nuclear da  $\beta$ -catenina e carcinoma seroso de ovário com alto grau de malignidade (LEE et al., 2003). Em células de carcinoma endometrial a  $\beta$ -catenina nuclear pode simultaneamente induzir a ativação da

trajetória p53-p21 WAF1 e a super expressão da ciclina D1, resultando na supressão da proliferação celular ou indução do envelhecimento celular, sugerindo que a acumulação nuclear da  $\beta$ -catenina seja sinal inicial da perda de diferenciação (SAEGUSA et al., 2004).

Castro et al., (2000) observaram a expressão nuclear e citoplasmática da  $\beta$ -catenina em CEC de esôfago, sendo que os tumores que apresentaram marcação nuclear exibiram alta atividade proliferativa, verificada através da marcação pelo Ki-67. E, segundo esses autores, sugeriu-se que a mutação presente no gene da  $\beta$ -catenina, usualmente, possa ser demonstrada através do acúmulo da  $\beta$ -catenina no citoplasma e no núcleo, verificada pela técnica de imunistoquímica.

Estudo realizado em 118 espécimes de CEC de cabeça e pescoço verificou a perda de expressão da  $\beta$ -catenina da membrana plasmática e a presença de  $\beta$ -catenina no citoplasma celular de alguns tumores analisados. Entretanto, a presença nuclear desta proteína não foi verificada, sendo, para estes autores, achado incomum para esse tipo de tumor (RODRIGUEZ-PINILLA et al., 2005).

O CEC da cavidade bucal expressa onze membros dos dezenove existentes da família Wnt (3, 3a, 4, 5a, 5b, 6, 7a, 7b, 10b, 11 e 14), além de grupo de sinais de ativação, sugerindo-se que o aumento da expressão dessas proteínas e de sua trajetória de sinalização aceleram a progressão do tumor, sendo que esses sinais são predominantemente ativados em células tumorais presentes no front de invasão (URAGUCHI et al., 2004).

Em relação ao padrão de marcação da Wnt-5a, foi verificado que a intensidade de marcação variava entre os casos. Constatou-se que 27,78% (10/36) apresentaram baixa intensidade de marcação, 47,22% (17/36) apresentaram média

intensidade de marcação e 25,00% (9/36) apresentaram alta intensidade de marcação.

Com referência aos tumores bem diferenciados (03), todos exibiram padrão de marcação nuclear/citoplasmático, sendo que dois exibiram alta intensidade de marcação e um, média intensidade de marcação. Dentre os tumores pouco diferenciados (6), 66,67% (4/6) apresentaram padrão de marcação nuclear/citoplasmático e 33,33% (2/6) exibiram o padrão de marcação predominantemente citoplasmático. Cinquenta por cento dos tumores exibiram média intensidade de marcação e apenas um tumor apresentou baixa intensidade. Contudo, essa análise não foi estatisticamente significativa, possivelmente porque o número de casos bem e pouco diferenciados foram bastante inferiores aos casos de CEC moderadamente diferenciados.

Foi encontrada relação estatística significativa quando avaliado a média do percentual de células marcadas com a intensidade de marcação da Wnt-5a, onde se verificou que quanto maior a média do percentual de células marcadas, maior a intensidade de marcação da Wnt-5a ( $p=0,000$ ). Em relação à localização da lesão e a imunomarcação da Wnt-5a, observou-se que nas regiões de rebordo alveolar inferior e, principalmente, assoalho bucal, consideradas como àquelas onde o CEC apresenta comportamento mais agressivo, foi encontrado menor média de percentual de marcação desta proteína ( $p=0,004$ ). Dos nove tumores localizados nesta região, nove foram classificados como moderadamente diferenciado e apenas um como pouco diferenciado. Ou seja, esses tumores foram os únicos dos grupos moderadamente diferenciados e pouco diferenciados que apresentaram baixa intensidade de marcação. Através dos resultados, acreditamos não haver relação entre a intensidade de marcação com a graduação histológica de malignidade. É

possível que essa seja característica apenas destas regiões, independente de sua classificação histológica. Entretanto, acreditamos que para que haja resultados mais conclusivo é necessário maior representação na amostra de tumores com essa localização.

Ao contrário da  $\beta$ -catenina, não existe consenso quanto à expressão da Wnt-5a e a diferenciação do tumor. O que se tem observado, é que a depender da localização primária, os tumores podem exibir aumento de expressão da proteína ou redução. A expressão da Wnt-5a já foi verificada em tumor de cérebro (HOWNG et al., 2002), assim como em estágios avançado de câncer gástrico, onde constatou-se que sua super expressão, está diretamente relacionada com o pior prognóstico (KURAYOSHI et al., 2006).

Em contraste com os membros Wnt promotores da sinalização canônica, os quais apresentam super expressão em muitos cânceres, dados recente mostraram evidências de que a Wnt-5a, também desempenha papel importante na iniciação e progressão do câncer. Entretanto a exata natureza dessa função ainda é controversa. A função desta proteína, tanto na supressão quanto na promoção do tumor é dependente de fatores intra e extracelulares. A presença de receptores, a interação entre os diferentes tipos celulares e a regulação do gradiente de Wnt-5a pelos componentes da matriz influenciam na complexa rede de sinalização (PUKROP; BINDER, 2008). Uma das teorias vigentes é a de que a Wnt-5a é um ligante representativo que ativa a trajetória independente da  $\beta$ -catenina, durante a sinalização Wnt. Entretanto, a exata relação entre a trajetória independente da  $\beta$ -catenina e a carcinogênese é desconhecida (HUANG et al., 2005; KURAYOSHI et al., 2006).

Diversas moléculas são capazes de interagir com a  $\beta$ -catenina. O estudo acerca das funções biológicas da  $\beta$ -catenina pode demonstrar que essa molécula apresenta múltiplas funções, pois combina características de proteína de adesão nas junções entre as células, bem como de fator transcricional através de diferentes vias de sinalização (BARTH; NÄTHKE; NELSON, 1997).

Neste estudo não constatamos relação estatisticamente significativa entre a  $\beta$ -catenina e a Wnt-5a, possivelmente, devido ao tamanho da amostra e da grande predominância dos CECs moderadamente diferenciados. Verificamos que nos tumores bem diferenciados todos os três casos apresentaram padrão de marcação nuclear/citoplasmático para Wnt-5a e intensidade de marcação média (um caso) e alta (dois casos) e o padrão de marcação para  $\beta$ -catenina membranosos/citoplasmático (dois casos) e citoplasmático (um caso). Nos tumores moderadamente e pouco diferenciados predominou o padrão de marcação citoplasmático com menos de 20% de marcação nuclear para a  $\beta$ -catenina e quanto a expressão da Wnt-5a nesses tumores, verificou-se predomínio de marcação predominantemente citoplasmática e nuclear/citoplasmático e intensidade de marcação variável.

Entretanto, nos nove casos localizados em rebordo alveolar inferior e assoalho bucal, os quais apresentaram menor média de percentual de células marcadas e de intensidade de marcação para a Wnt-5a, verificamos que em oito o padrão de coloração para a  $\beta$ -catenina foi o citoplasmático com menos de 20% de marcação nuclear. Entretanto, podemos sugerir que a expressão citoplasmática com menos de 20% dos núcleos marcados para a  $\beta$ -catenina possa estar relacionada a localização nuclear/citoplasmático da Wnt-5a, assim como a intensidade de marcação baixa e média.

Na literatura já existe evidência de que a perda de Wnt-4 e a super expressão da Wnt-5a possam atuar como possíveis marcadores moleculares para o fenótipo mais invasivo e agressivo do CEC. Esse dado foi observado ao se comparar a expressão dos genes WNT-1, 2, 3, 4, 5a, 6 e 7a em linhagem de células de CEC de boca com ceratinócitos normais, onde se observou relação inversa entre a expressão do WNT-4 e da WNT-5A, ou seja, enquanto algumas linhagens de células não apresentavam expressão para o WNT-4, essas mesmas linhagens de células apresentavam forte expressão para o WNT-5A. Essas linhagens de células apresentaram redução da expressão de E-caderina e elevada expressão da vimentina, acompanhada da expressão do *Snail* e  $\delta$  EF1, sugerindo a associação do WNT-4 com o fenótipo epitelial e o WNT-5A com o fenótipo mesenquimal das células do CEC. Todas as células do carcinoma com fenótipo epitelial, apresentaram aumento da expressão de ao menos um gene WNT. Esse achado sugere a forte correlação entre a sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina com a formação e progressão do tumor (TAKI et al., 2003).

Com os resultados obtidos não podemos afirmar qualquer relação entre a  $\beta$ -catenina e a Wnt-5a. Tanto é possível que ambas as proteínas tenham atuação importante na progressão do tumor, mas sem que a ação de uma iniba a função da outra, verificada através da ausência de correlação estatística, como é possível que a  $\beta$ -catenina possa, através da via independente da Wnt-5a ser acumulada no citoplasma e sofrer e posterior migração para o núcleo da célula, como verificado nos tumores localizados em rebordo alveolar inferior e assoalho bucal, que expressaram baixos índices de Wnt-5a e marcação nuclear da  $\beta$ -catenina. Contudo, é fato que para a existência de resultados mais específicos, novas análises são

necessárias, principalmente com amostras maiores e possibilidade de estudos prospectivos.

## **7. CONCLUSÃO**

Com base nos resultados encontrados neste estudo, pode-se inferir que:

- A perda de diferenciação do tumor está intimamente relacionada a menor imunexpressão da  $\beta$ -catenina em membrana plasmática e sua maior expressão em núcleo e citoplasma celular. Ou seja a redução da expressão em membrana desta proteína nos CEC menos diferenciados resulta na perda da adesão entre as células, permitindo que pequenos grupos celulares possam migrar pelos vasos facilitando a metástase;

- Existe relação direta entre o percentual de células marcadas e a intensidade de marcação da Wnt-5a, ou seja quanto maior o percentual de células marcadas, maior a intensidade da imunomarcação;
- A presença da expressiva marcação da Wnt-5a pode estar associada ao seu fenótipo mesenquimal nas células CEC de boca, sendo um possível marcador molecular para o fenótipo mais invasivo e maligno durante a carcinogênese;
- As regiões de assoalho bucal e rebordo alveolar inferior, apresentaram características de marcação destoante das demais localidades, uma vez que se verificou menor percentual de células marcadas e menor intensidade de marcação para Wnt-5a;
- Não encontramos qualquer relação entre a imunexpressão da Wnt-5a e da  $\beta$ -catenina. Entretanto, observamos que, aparentemente, essas proteínas atuam de forma independente, onde a ação de uma proteína não inibe a função da outra. De qualquer forma, não está descartado a possibilidade da Wnt-5a atuar como coadjuvante na inibição da degradação da  $\beta$ -catenina no citoplasma, resultando, conseqüentemente, no seu acúmulo e posterior migração para o núcleo da célula.

## REFERÊNCIAS

AMORIM, A. G.; AMORIM, R. F. B.; FREITAS, R. A. Estudo epidemiológico do carcinoma epidermóide oral: análise de 85 casos. **Odontologia Clínico-Científica**, v.1, n. 1, p. 41- 45, 2002.

ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J. G.; LUNA, M. Malignancy grading of squamous cell carcinoma in the floor of the mouth related to clinical evaluation. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 94, n. 4, p. 347-358, 1986.

ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J. G.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 95, n. 3, p. 229-249, 1987.

ANNEROTH, G.; HASSEN, L. S. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 92, n.5, p. 448-468, 1984.

BACHMANN, I. M., et al. Importance of p-cadherin,  $\beta$ -catenin, and Wnt5a-Frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 24, p. 8606-8614, 2005.

BÁNKFALVI, A., et al. Deranged expression of the E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 31, n.8, p. 450-457, 2002.

BARTH, A. I.; NÄTHKE, I. S.; NELSON, W. J. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 683-690, 1997.

BEAVON, I. R. G. The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis: structure, function and regulation. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 13, p. 1607-1620, 2000.

BEHRENS, J. Cadherins and catenins: Role in signal transduction and tumor progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 18, n.1, p. 15-30, 1999.

BEHRENS, J.; LUSTIG, B. The Wnt connection to tumorigenesis. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 477-487, 2004.

BELL, R. B., et al. Tongue cancer: is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? **Journal of Oral Maxillofacial and Surgery**, v. 65, n.2, p. 229-236, 2007.

BEN-ZE'EV, A.; GEIGER, B. Differential molecular interactions of  $\beta$ -catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 629-639, 1998.

BEN-ZE'EV, A.; SHTUTMAN, M.; ZHURINSKY, J. The integration of cell adhesion with gene expression: the role of beta-catenin. **Experimental Cell Research**, v. 261, n. 1, p. 75-82, 2000.

BLANC, E., et al. Wnt-5a gene expression in malignant human neuroblasts. **Cancer Letters**, v. 228, n. 1-2, p. 117-123, 2005.

BRODERS, A. C. The microscopic grading of cancer. **The Surgical Clinics of North America**, v. 21, p. 947-962, 1941.

- BRYJA, V.; et al. Wnt-5a induces disheveled phosphorylation and dopaminergic differentiation via a CK1- dependent mechanism. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 4, p. 586-595, 2007.
- BRYNE, M., et al. Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. **Journal of Oral pathology & Medicine**, v. 20, n. 8, p. 369-372, 1991.
- CADIGAN, K. M.; NUSSE, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes & development**, v.11, n. 24, p. 3286-3305, 1997.
- CARVALHO, M. B., et al. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma de cavidade oral no sexo feminino. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 3, p.208-214, 2001.
- CASTRO, J., et al.  $\beta$ -catenin expression pattern in primary oesophageal squamous cell carcinoma. Relationship with clinicopathologic features and clinical outcome. **Virchows Archiv**, v. 437, n.6, p. 599-604, 2000.
- CHANDU, A.; ADAMS, G.; SMITH, A. C. H. Factors affecting survival in patients with oral cancer: an Australian perspective. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 34, n.5, p. 514-520, 2005.
- CHEN, R. H.; DING, W. V.; McCORMICK, F. Wnt signaling to  $\beta$ -catenin involves two interactive components. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 23, p. 17894-17899, 2000.
- CHENG, C., et al. Wnt 5a-mediated non-canonical Wnt signaling regulates human endothelial cell proliferation and migration. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 365, n.2, p. 285-290, 2008.
- CHOI, Y. S., et al. Prognostic significance of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in resected stage I non-small cell lung cancer. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 24, n.3, p. 441-449, 2003.
- CHOW, V., et al. A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 127, n. 1, p. 59-63, 2001.
- CLARK, C. C., et al. Molecular cloning of the human proto-oncogene Wnt-5A and mapping of the gene (WNT5A) to chromosome 3p14-p21. **Genomics**, v.18, n. 2, p. 249-260, 1993.

- CONACCI – SORRELL, M.; ZHURINSKY, J.; BEN – ZE'EV, A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 8, p. 987-991, 2002.
- CONG, F., et al. Requirement for a nuclear function of  $\beta$ -catenin in Wnt signaling. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 23, p. 8462-8470, 2003.
- CONG, F.; SCHWEISER, L.; VARMUS, H. Wnt signals across the plasma membrane to activate the  $\beta$ -catenin by forming oligomers containing its receptor, frizzled and LRP. **Development**, v. 131, n.20, p. 5103-5115, 2004.
- COSTA, A. L. L., et al. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 71, n. 2, p. 181-187, 2005.
- CUI, J., et al. Mutation and overexpression of the  $\beta$ -catenin gene may play an important role in primary hepatocellular carcinoma among chinese people. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 127, n. 9, p. 577-581, 2001.
- DAA, T., et al. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in adenoid cystic carcinoma. **Modern Pathology : An Official Journal of The United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v.17, n. 12, p. 1475-1482, 2004.
- DANIELSON, K. G., et al. Characterization of the complete genomic structure of the human WNT-5A gene, functional analysis of its promoter, chromosomal mapping, and expression in early human embryogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 52, p. 31225-31234, 1995.
- De AGUIAR, A. F. Jr.; KOWALSKI, L. P.; De ALMEIDA, O. P. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. **Oral Oncology**, v. 43, n. 6, p. 593-601, 2007.
- De VISSHER, J. G. A. M., et al. Epidemiology of câncer of the lip in the Netherlands. **Oral Oncology**, v. 34, n. 5, p. 421-426, 1998.
- DEDIVITIS, R. A. et al. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, n. 1, p. 35-40, 2004.
- DURAZZO, M. D., et al. 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**, v. 60, n. 4, p. 293-298, 2005.

ENNEROTH, C. M.; HJERTMAN, L.; MORBERGER, G. Squamous cell carcinomas of the palate. **Acta Oto-laryngologica**, v. 73, n. 5, p. 418-427, 1972.

FILLIES, T., et al. Catenin expression in T1/2 carcinomas of the floor of the mouth. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 34, n.8, p. 907-911, 2005.

GAO, S., et al. Cytoplasmic expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 34, n.2, p. 116-119, 2005.

GERVÁSIO, O. L. A. S., et al. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a brazilian population. **Brazilian Dental Journal**, v. 12, n. 1, p. 57-61, 2001.

GÓES, Caroline. Perfil epidemiológico do paciente com câncer de cabeça e pescoço atendido no setor de cabeça e pescoço no setor de odontologia do Hospital Aristides Maltez no ano de 2006. 2007. 80 f. **Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica)** - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

GONZALES-MOLES, M. A., et al. Prognosis value of the expression of Ki-67 for squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Acta Stomatologica Belgica**, v. 93, n. 4, p. 159-165, 1996.

GONZÁLEZ-SANCHO, J. M., et al. Wnt proteins induce dishevelled phosphorylation via an LRP5/6 – independent mechanism, irrespective of their ability to stabilize  $\beta$ -catenin. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 11, p. 4757-4768, 2004.

GORDON, M. D.; NUSSE, R. Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. **Journal of Biology Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22429-22433, 2006.

GUERRA, E. N. S. et al. Expressão imunohistoquímica da ciclina D1 e do p 16 em carcinoma epidermóide de boca: correlação com sistema TNM e localização. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 1, p. 31-37, 2005.

HINOI, T., et al. Complex formation of Adenomatous Polyposis Coli gene product and Axin facilitates glycogen synthase kinase-3 $\beta$ -dependent phosphorylation of  $\beta$ -catenin and down-regulates  $\beta$ -catenin. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 275, n. 44, p. 34399-34406, 2000.

HIROHASHI, S.; KANAI, Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. **Cancer Science**, v. 94, n. 7, p. 575-581, 2003.

- HOWNG, S. L., et al. Differential expression of Wnt genes,  $\beta$ -catenin and E-cadherin in human brain tumors. **Cancer Letters**, v. 183, n.1, p. 95-101, 2002.
- HUANG, C. L., et al. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor – an expression in non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 34, p. 8765 – 8773, 2005.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde (BRASIL). Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional do Câncer**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil: Rio de Janeiro, 2005.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde (BRASIL). Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional do Câncer**. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2008/2009: Incidência de Câncer no Brasil: Rio de Janeiro, 2007.
- ISHIDA, K., et al. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. **Molecular Cancer**, v. 62, n. 6, p. 1-7, 2007.
- ISHIZAKI, Y., et al. Immunohistochemical analysis and mutacional analyses of  $\beta$ -catenin, Axin family and APC genes in hepatocelular carcinomas. **International Journal of Oncology**, v. 24, n.5, p. 1077-1083, 2004.
- IWAI, S., et al. Mutations of the APC, beta-catenin and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.131, n.12, p. 773-782, 2005.
- IYPE, E. M., et al. Squamous cell cancer of the buccal mucosa in Young adults. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 42, n.3, p. 185-189, 2004.
- JAKOBSSON, P.A., et al. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. **Acta Radiologica: Therapy, Physics, Biology**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 1973.
- JANKOWSKI, J. A., et al. Cadherin and catenin biology represent a global mechanism for epithelial cancer progression. **Journal of Clinical Pathology**, v. 50, n.6, p. 289-290, 1997.
- JÖNSSON, M., et al. Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. **Cancer Research**, v. 62, n. 2, p. 409-416, 2002.
- KADEMANI, D., et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 11, p. 1599-1605, 2005.

- KIKUCHI, A.; YAMAMOTO, H. Tumor formation due to abnormalities in the  $\beta$ -catenin-independent pathway of Wnt signaling. **Cancer Science**, v. 99, n. 2, p. 202-208, 2008.
- KIKUCHI, A.; YAMAMOTO, H.; KISHIDA, S. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. **Cellular Signaling**, v. 19, n. 4, p. 659-671, 2007.
- KIM, K. M., et al. Epidemiologic survey of head and neck cancers in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 18, p. 80-87, 2003.
- KISHIDA, S., et al. Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, directly interacts with Adenomatous Polyposis Coli and regulates the stabilization of  $\beta$ -catenin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 18, p. 10823 -10826, 1998.
- KOHN, A. D.; MOON, R. T. Wnt and calcium signaling:  $\beta$ -catenin-independent pathways. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3-4, p. 439 – 446, 2005.
- KUDO, Y., et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 16, p. 5455-5463, 2004.
- KÜHL, M., et al. The Wnt/ $Ca^{+2}$  pathway a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. **Trends in Genetics : TIG**, v. 16, n. 7, p. 279-283, 2000.
- KURAYOSHI, M., et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. **Cancer Research**, v. 66, n. 21, p. 10439-10448, 2006.
- KURTZ, A. K., et al. Decreased E-cadherin but not  $\beta$ -catenina expression is associated with vascular invasion and decreased survival in head and neck squamous cell carcinomas. **Otolaryngology – Head and Neck Surgery**, v. 134, n. 1, p142-146, 2006.
- LEE, C. M., et al.  $\beta$ -catenin nuclear localization is associated with grade in ovarian serous carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 88, n. 3, p. 363-368, 2003.
- LIN, Y. C., et al. Prognostic and clinicopathological features of E-cadherins,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin,  $\gamma$ -catenin and cyclin D<sub>1</sub> expression in human esophageal squamous cell carcinoma. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 10, n. 22, p. 3235-3239, 2004.
- LIU, G.; BAFICO, A.; AARONSON, S. A. The mechanism of endogenous receptor activation functionally distinguishes prototype canonical and noncanonical Wnts. **Molecular and Celular Biology**, v. 25, n. 9, p. 3475-3482, 2005.

- LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. A. S. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 33, n. 9, p. 525-532, 2004.
- LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annual Review of Cell Biology**, v. 20, p. 781-810, 2004.
- LOPEZ-GONZALEZ, J. S., et al. Localization and level of expression of  $\beta$ -catenin in human laryngeal squamous cell carcinoma. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v.130, n. 1, p. 89-93, 2004.
- LUSTIG, B.; BEHERNS, 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.
- MAHOMED, F; ALTINI, M, MEER, S. Altered E-cadherin/ $\beta$ -catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. **Oral Diseases**, v.13, n. 4, p. 386-392, 2007.
- MENZIN, J.; LINES, L. M.; MANNING, L. N. The economics of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, v. 15, n. 2, p. 68-73, 2007.
- MIGUEL, M. C. C.; AMORIM, R. F. B. Multifuncionalidade da beta-catenina e suas implicações na patologia. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, v. 3, n. 2, p. 57-61, 2004.
- MILLER, J. R. The Wnts. **Genome Biology**, v.3, n.1, 2001.
- MIZUSHIMA, T., et al. Wnt-1 but not epidermal growth factor induces  $\beta$ -catenina/T-cell factor-dependent Transcription in Esophageal cancer cells. **Cancer Research**, v. 62, n. 1, p. 227-282, 2002.
- NAGAFUCHI, A. Molecular architecture of adherens junctions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 600-603, 2001.
- NELSON, W. J.; NUSSE, R. Convergence of Wnt,  $\beta$ -catenin, and cadherin pathways. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1483-1487, 2004.
- NICHOLS, A. C.; BHATTACHARYYA, N. Racial differences in stages and survival in head and neck squamous cell carcinoma. **The laryngoscope**, v. 117, n. 5, p. 770-775, 2007.
- NINOMIYA, I., et al. Alteration of  $\beta$ -catenina expression in esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 85, n. 6, p. 757-761, 2000.

- NUSSE, R. Wnt signaling in disease and in development. **Cell Research**, v.15, n.1, p. 28-32, 2005.
- PERUSSI, M. R., et al. Carcinoma epidermóide da boca em idosos de São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 341-344, 2002.
- PIRINEN, R. T., et al. Reduced expression of  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin, and  $\gamma$ -catenin is associated with high cell proliferation in non-small cell lung cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 5, p. 391-395, 2001.
- POLAKIS, P. Wnt signaling and cancer. **Genes & Development**, v. 14, n. 15, p. 1837-1851, 2000.
- PRUNIER, C.; HOCEVAR, B. A.; HOWE, P. H. Wnt signaling: Physiology and Pathology. **Growth Factors**, v. 22, n. 3, p. 141-150, 2004.
- PUKROP, T.; BINDER, C. The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 3, p. 259 – 66, 2008.
- RIPPEY, J. J. Why classify basal cell carcinomas? **Histopathology**, v.32, n.5, p. 393-398, 1998.
- RODRIGUEZ-PINILLA, M., et al. B-catenin, Nf- $\kappa$ B and FAS protein expression are independent events in head and neck cancer: study of their association with clinical parameters. **Cancer Letters**, v. 230, n. 1, p. 141-148, 2005.
- ROMAN-GOMEZ, J., et al. WNT5A, a putative tumor suppressor of lymphoid malignancies, is inactivated by aberrant methylation in acute lymphoblastic leukaemia. **European Journal of Cancer**, v. 43, n. 18, p. 2736-2746, 2007.
- SAEGUSA, M., et al.  $\beta$ -catenin simultaneously induces activation of p 53-p21WAF1 pathway and overexpression of cyclin D1 during squamous differentiation of endometrial carcinoma cells. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 5, p. 1739-1749, 2004.
- SCULLY, C.; BAGAN, J. V. Recent advances in oral oncology. **Oral Oncology**, v. 43, n. 2, p. 107-115, 2007.
- SHTUTMAN, M., et al. The cyclin D1 gene is a target of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5522-5527, 1999.
- SMITH, M. E.; PIGNATELLI, M. The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/catenin complex. **Histopathology**, v. 31, n. 2, p. 107-111, 1997.

- TAKI, M., et al. Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. **Cancer Science**, v. 94, n. 7, p. 593-597, 2003.
- UEDA, G., et al. Aberrant expression of  $\beta$  and  $\gamma$ -catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35, n. 4, p. 356-361, 2006.
- URAGUCHI, M., et al. Activation of Wnt family expression and signaling in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 4, p. 327-332, 2004.
- VEECK, E. B., et al. Estudo epidemiológico dos carcinomas espinocelulares na cavidade bucal. **Odonto Ciência**, v. 7, n.14, 1992.
- VENESS, M. J., et al. Squamous cell carcinoma of the lip. Patterns of relapse and outcome: Reporting the westmead Hospital experience, 1980 – 1997. **Australian Radiology**, v. 45, n. 2, p. 195-199, 2001.
- WANG, L., et al. Altered expression of desmocollin 3, desmoglein 3 and  $\beta$ -catenin oral squamous cell carcinoma: Correlation with lymph node metastasis and cell proliferation. **Virchows Archiv**, v. 451, n. 5, p. 959-966, 2007.
- WIJNHOFEN, B. P. L.; DINJENS, W. N. M.; PIGNATELLI, M. E. Cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. **The British Journal of Surgery**, v. 87, n. 8, p. 992-1005, 2000.
- WILLERT, K.; NUSSE, R.  $\beta$ -catenin: a key mediator of Wnt signaling. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 8, n. 1, p. 95-102, 1998.
- WILLIAMS, H. K. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, n. 4, p. 165-172, 2000.
- WILLIAMS, H. K., et al. Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 27, n. 7, p. 308-317, 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. **World Health Organization Classification of Tumors**. IARC Press: Lyon 2005.
- YANG, F., et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits death receptor-mediated apoptosis and promotes invasive growth of HNSCC. **Cellular Signaling**, v. 18, n. 5, p. 679-687, 2006.

YEH, K. T., et al. Correlation between protein expression and epigenetic and mutation changes of Wnt pathway-related genes in oral cancer. **International Journal of Oncology**, v. 23, n. 4, p. 1001-1007, 2003.

YU, Z., et al.  $\beta$ -catenin functions mainly as an adhesion molecule in patients with squamous cell cancer of the head and neck. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 7, p. 2471-2477, 2005.

ZHANG, W. M., et al. Effect of Wnt -1 on  $\beta$ -catenin expression and its relation to Ki-67 and tumor differentiation in oral squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**, v. 13, n. 6, p. 1095-1099, 2005.

ZHURINSKY, J.; SHTUTMAN, M.; BEN- ZE'EV, A. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 18, p. 3127-3129, 2000.