**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

NATÁLIA GALVÃO GARCIA

**Avaliação da expressão de β -catenina e ciclina D1 como
biomarcadores preditivos para o câncer de lábio**

**BAURU
2016**

NATÁLIA GALVÃO GARCIA

Avaliação da expressão de β -catenina e ciclina D1 como biomarcadores preditivos para o câncer de lábio

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

**BAURU
2016**

G165a Garcia, Natália Galvão
Avaliação da expressão de β -catenina e ciclina D1
como biomarcadores preditivos para o câncer de lábio /
Natália Galvão Garcia – Bauru, 2016.
117 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Granada- UGR
Protocolo nº: 191/CEIH/2016
Data: 04/07/2016

DEDICATÓRIA

À minha mãe,

Silvana Galvão, meu porto seguro, pois, todas às vezes que tropecei ou caí, foi nas suas palavras que encontrei forças para seguir em frente. Obrigada pelo apoio e amor incondicional.

À minha orientadora,

Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, por sempre me orientar em todos os sentidos, por não ter me deixado desistir diante dos obstáculos e por me fazer acreditar que eu era capaz. Obrigada pelo carinho e pela confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por está sempre no controle da minha vida, me permitindo que eu chegasse até aqui. Ao Senhor toda honra e toda glória.

Aos meu país, Silvana Galvão e Marçal Lourençoní Garcia, pelo amor inigualável.

À minha irmã, Marcela Galvão Garcia, pelo apoio, amizade e companheirismo.

Aos meus avós, Vicente Galvão e Margarida Araújo Galvão, exemplos de vida, pelas orações, amor e incentivo sempre.

À Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, meu grande exemplo, por ter sido muito mais do que uma orientadora, e por todos os ensinamentos que me permitiram chegar até aqui. Obrigada pelo apoio e incentivo, sem você essa vitória não seria possível.

Ao Prof. Dr. Miguel Ángel González Moles, por tornar possível a realização desse trabalho. Obrigada por ter me recebido tão bem, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos compartilhados.

A Profa. Dra. Izabel Ruiz Ávila, pela sua cordial atenção e pelas contribuições concedidas ao trabalho.

Ao Prof. Dr. Jose Antônio Gil Montoya, por toda orientação dedicada a mim.

Ao Prof. Dr. Manuel Bravo e ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris, pelo auxílio na análise estatística desse trabalho.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues e à Profa. Dra. Eliana Maria Minicucci, pela prestatividade e disponibilidade sempre.

Ao Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann, pelo apoio e orientação sempre.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira, à Profa. Dra. Vanessa Soares Lara e ao Prof. Dr. Alberto Consolaro, pelos conhecimentos compartilhados durante esses anos.

Às funcionárias, Maria Cristina Carrara Filippi e Marina dos Santos Corrêa, pelo carinho e pela prestatividade.

À Fátima Aparecida Silveira, pela atenção e pela amizade.

Aos amigos que estiveram ao meu lado durante esses anos e a todos que me incentivaram e contribuíram para esta conquista.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa da Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, diretora desta instituição.

À comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson.

À Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, coordenadora da Área de Concentração em Patologia Bucal do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

À Universidade de Granada (Espanha), na pessoa da Profa. Dra. Pilar Aranda Ramírez, reitora da universidade.

À comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de Granada (Espanha), na pessoa do Prof. Dr. Jose Juan García Moleón.

Ao Departamento de Estomatología da Faculdade de Odontologia da Universidade de Granada (Espanha), na pessoa do Prof. Dr. José Manuel Navajas Rodríguez de Mondelo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida pelo Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), processo nº BEX 4534/14-0.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Cnpq, pelo auxílio financeiro via reserva técnica e pela bolsa de doutorado no país, processo nº 141641/2013-4.

*“Às vezes Deus te leva para o caminho mais longo, não
para te punir, mas para te preparar.”*

Padre Fábio de Melo

RESUMO

Um dos objetivos da pesquisa científica, atualmente, é encontrar biomarcadores que possam auxiliar na definição da probabilidade de progressão das lesões orais displásicas, e ainda sejam capazes de identificar os principais agentes moleculares envolvidos na carcinogênese de um determinado tipo de tumor. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a expressão de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 em 15 espécimes de epitélio oral normal, 45 queilites actínicas displásicas e em 30 carcinomas espinocelulares de lábio. Essa amostra foi constituída por pacientes tratados na Faculdade de Medicina de Botucatu (Brasil) e no Hospital Clínico San Cecílio de Granada (Espanha). O grau de displasia epitelial e de diferenciação tumoral foi classificado com base nos critérios definidos pela Organização Mundial da Saúde. A avaliação dos biomarcadores foi realizada por meio da técnica imunohistoquímica, dividindo a espessura do epitélio em quatro compartimentos (basal, suprabasal, terço médio e terço superior) para o grupo controle e para as queilites actínicas e em três compartimentos (basal, suprabasal e região interna) para o grupo dos carcinomas espinocelulares de lábio. Para a comparação da média de expressão de cada marcador, nas diferentes localizações do epitélio foi utilizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis. Para a correlação da expressão dos três marcadores entre os grupos foi utilizada a correlação de Spearman, com nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram uma perda discreta da expressão membranosa de β -catenina na camada basal das queilites actínicas com displasia epitelial intensa (Cis) e nos carcinomas espinocelulares de lábio, assim como uma expressão citoplasmática e nuclear, discreta e diretamente proporcional à desorganização epitelial nas camadas basal e suprabasal das queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio. Notou-se também um aumento da expressão de ciclina D1 e Ki-67 na camada basal à medida que aumentava a desorganização epitelial. Houve uma associação estatisticamente significativa da expressão de ciclina D1 e Ki-67 na camada suprabasal do grupo controle ($p=0,030$) e das queilites actínicas ($p=0,001$) e ainda na região interna dos carcinomas espinocelulares de lábio ($p=0,000$). Não houve correlação significativa entre as expressões nucleares de β -catenina e de ciclina D1. Nossos resultados reforçam que a β -catenina, a ciclina D1 e o Ki-67, podem ser utilizados como biomarcadores preditivos para o câncer de lábio. Além disso, sugerem que a β -catenina e a ciclina D1 participam da carcinogênese labial, em eventos independentes da via de sinalização/Wnt.

Palavras-chave: Queilite actínica. Displasia epitelial. Carcinoma espinocelular de lábio.

ABSTRACT

Evaluation of β -catenin and cyclin D1 expression as predictive biomarkers for lip cancer

One of the goals of scientific research today is to find predictive biomarkers that can help define the probability of progression of dysplastic oral lesions, and are still able to identify key molecular agents involved in the carcinogenesis of a particular type of tumor. The objective of this study was to investigate β -catenin, cyclin D1 and Ki-67 expression in 15 specimens of normal oral epithelium, 45 dysplastic actinic cheilitis and 30 squamous cell carcinoma of the lip. This sample consisted of patients treated at the Botucatu Medicine School (Brazil) and the Clinical Hospital San Cecilio of Granada (Spain). The degree of epithelial dysplasia and tumor differentiation was classified based on the criteria defined by the World Health Organization. The evaluation of biomarkers was performed by immunohistochemical technique, dividing the thickness of the epithelium into four compartments (basal, suprabasal, middle third and upper third) for the control group and actinic cheilitis and three compartments (basal, suprabasal and inner region) to the group of squamous cell carcinoma of the lip. For comparing the average expression of each marker in different locations of the epithelium we used the statistical test of Kruskal-Wallis. For the correlation of the three markers expression between the groups was used Spearman, with 5% significance level. The results showed a slight loss of membranous expression of β -catenin in the basal layer of actinic cheilitis with severe epithelial dysplasia (Cis) and squamous cell carcinoma of the lip, and a cytoplasmic and nuclear expression, slight and directly proportional to the epithelial disorganization in layers basal and suprabasal of actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. It was also noted an increase in expression of cyclin D1 and Ki-67 in the basal layer as increased epithelial disorganization. There was a statistically significant association of cyclin expression D1 and Ki-67 in the suprabasal layer of the control group ($p=0.030$) and actinic cheilitis ($p=0.001$) and also in the inner region of squamous cell carcinoma of the lip ($p=0.000$). There was no significant correlation between the nuclear expression of β -catenin and cyclin D1. Our results emphasize that β -catenin, cyclin D1 and Ki-67 can be used as predictive biomarkers for lip cancer. Moreover, they suggest that β -catenin and cyclin D1 acts on the lip carcinogenesis, in independent events signaling pathway/Wnt.

Keywords: Actinic cheilitis. Epithelial dysplasia. Squamous cell carcinoma of lip.

RESUMEN

Evaluación de la expresión de β -catenina y la ciclina D1 como biomarcadores predictivos para el carcinoma del labio

Uno de los objetivos de la actual investigación científica es encontrar biomarcadores predictivos que pueden ayudar a definir la probabilidad de progresión de las lesiones orales displásicas, y todavía son capaces de identificar los agentes moleculares clave que intervienen en la carcinogénesis de un tipo particular de tumor. El objetivo de este estudio fue investigar la expresión de β -catenina, ciclina D1 y Ki-67 en 15 muestras de epitelio oral normal, queilitis actínica displásicas 45 y 30 carcinoma de células escamosas del labio. Esta muestra estaba compuesta por los pacientes tratados en la Facultad de Medicina de Botucatu (Brasil) y en el Hospital Clínico San Cecilio de Granada (España). El grado de displasia epitelial y la diferenciación del tumor se clasificaron en base a los criterios definidos por la Organización Mundial de la Salud. La evaluación de los biomarcadores se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica, dividiendo el epitelio en cuatro compartimientos (basal, suprabasal, tercio medio y tercio superior) para el grupo control y queilitis actínica y en tres compartimientos (basal, suprabasal y región interno) para el grupo de los carcinomas de células escamosas del labio. Para comparar el promedio de expresión de cada marcador en distintas ubicaciones del epitelio se utilizó el test estadístico de Kruskal-Wallis. Para la correlación de la expresión de los tres marcadores entre los grupos se utilizó Spearman, con un nivel de significación del 5%. Los resultados mostraron una ligera pérdida de expresión membranosa de β -catenina en la capa basal de la queilitis actínica con displasia epitelial severa (CIS) y en el carcinoma de células escamosas del labio, y una expresión citoplasmática y nuclear, discreto y directamente proporcional a la desorganización epitelial en capas basal y suprabasal de la queilitis actínica y carcinoma de células escamosas del labio. También se observó un aumento en la expresión de la ciclina D1 y Ki-67 en la capa basal como una mayor alteración epitelial. Se observó una asociación estadísticamente significativa de la expresión de ciclina D1 y Ki-67 en la capa suprabasal del grupo control ($p=0,030$) y la queilitis actínica ($p=0,001$) y también en la región interno de los carcinomas de células escamosas del labio ($p=0,000$). No existió correlación significativa entre la expresión nuclear de β -catenina y la ciclina D1. Nuestros resultados enfatizan que β -catenina, ciclina D1 y Ki-67 se pueden utilizar como biomarcadores predictivos para el cáncer de labio. Además, sugieren que β -catenina y ciclina D1 actúa en la carcinogénesis de labios, eventos independientes vía de señalización/Wnt.

Palabras clave: Queilitis actínica. Displasia epitelial. Carcinoma de células escamosas del labio.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Na ausência da via de sinalização de Wingless (Wnt) (A) β -catenina é fosforilada por um complexo multiprotéico (Axin, APC, CK1 e GSK3). A via de sinalização de Wnt é ativada (B) quando um receptor de baixa densidade como LRP5/6 forma com o co-receptor frizzled o complexo Wnt-Fz-LRP5/6. Este complexo vai então recrutar o complexo Axin e consequentemente vai impedir que ocorra a fosforilação da β -catenina. Logo, esta proteína irá se acumular no citoplasma e se translocar para o núcleo onde irá formar um complexo com TCF/LEF, o qual irá atuar na transcrição genética..... **30**
- Figura 2 -** Modelo de divisão celular assimétrica do epitélio oral normal. Cada célula progenitora divide-se assimetricamente em uma célula-filha com capacidade idêntica de proliferação e em uma célula transitória com um número limitado de divisões. A célula transitória é capaz de amplificar a divisão em três e cinco vezes até que todas as células filhas alcancem a diferenciação terminal..... **38**
- Figura 3 -** No grupo controle e nas queilites actínicas, o epitélio foi dividido em quatro compartimentos, camada basal, camada suprabasal, terço médio e terço superior..... **51**
- Figura 4 -** No grupo dos carcinomas espinocelulares, o epitélio foi dividido em três compartimentos, camada basal, camada suprabasal e região interna..... **51**
- Figura 5 -** Classificação histopatológica. A – Epitélio oral hiperplásico; B – Epitélio oral com displasia leve; C – Epitélio oral com displasia moderada; D – Epitélio oral com displasia intensa; E – Carcinoma bem diferenciado; F – Carcinoma moderadamente diferenciado (Hematoxilina e Eosina/200x)..... **61**
- Figura 6 -** Expressão de β -catenina na mucosa labial. A – Controle – expressão membranosa presente em todas as camadas epiteliais, com exceção do terço superior que foi negativo; e expressão citoplasmática e nuclear ausentes. B – Queilite actínica com displasia epitelial leve – expressão membranosa presente em todas as camadas epiteliais. C – Queilite actínica com displasia epitelial moderada – expressão membranosa presente em todas as camadas epiteliais, exceto terço superior e expressão citoplasmática e nuclear nas camadas basal e suprabasal. D – Carcinoma in situ/displasia epitelial intensa – perda discreta de expressão membranosa na camada basal e expressão citoplasmática e nuclear significativamente mais intensas nas camadas basal, suprabasal e região interna. (Imunohistoquímica – anti- β -catenina 200x)..... **69**

- Figura 7 -** Expressão de ciclina D1 na mucosa labial. A – Grupo controle – expressão discreta na camada basal e levemente mais intensa na camada suprabasal; B – Queilite actínica com displasia leve – expressão intensa na camada suprabasal e no terço médio; C – Queilite actínica com displasia moderada – aumento da intensidade da expressão nas camadas epiteliais (basal, suprabasal e terço médio); D – Queilite actínica com displasia intensa/Cis – expressão intensa na camada basal e suprabasal do epitélio tumoral desorganizado. (Imunohistoquímica – anti-ciclina D1 200x)..... **71**
- Figura 8 -** Expressão de Ki-67 na mucosa labial. A – Grupo controle – expressão discreta na camada basal e levemente mais intensa na camada suprabasal; B – Queilite actínica com displasia leve – expressão mais intensa do que no grupo controle, principalmente na camada suprabasal; C – Queilite actínica com displasia moderada – a expressão aumenta ainda mais sua intensidade na camada suprabasal e terço médio; D - Queilite actínica com displasia intensa/Cis – observa-se na camada basal um aumento da expressão à medida que aumenta a displasia epitelial. (Imunohistoquímica – anti-Ki-67 200x)..... **73**
- Figura 9 -** Expressão de β -catenina na mucosa labial. A – Controle – expressão membranosa presente em todas as camadas epiteliais, com exceção do terço superior e expressão citoplasmática e nuclear ausentes. B – Queilite actínica – expressão membranosa presente em todas as camadas epiteliais, com predomínio da expressão citoplasmática nas camadas basal, suprabasal e terço médio; expressão nuclear bastante discreta, presente nas camadas basal, suprabasal e terço médio. C – Carcinoma espinocelular de lábio - perda da expressão membranosa na camada basal e aumento das expressões citoplasmática e nuclear nas camadas basal, suprabasal e região interna. (Imunohistoquímica – anti- β -catenina 200x)..... **81**
- Figura 10 -** Expressão de ciclina D1 na mucosa labial. A – Grupo controle – expressão discreta na camada basal e levemente mais intensa na camada suprabasal; B – Queilite actínica – expressão mais intensa do que no grupo controle, principalmente na camada suprabasal, no entanto também pode ser observada no terço médio; C – Carcinoma espinocelular de lábio – comparando com os demais grupos, a expressão na camada basal mostrou ser ainda mais intensa, sendo possível observar que houve um aumento diretamente proporcional a desorganização epitelial. (Imunohistoquímica – anti-ciclina D1 200x)..... **83**

Figura 11 - Expressão de Ki-67 na mucosa labial. A – Grupo controle – expressão discreta na camada basal e levemente mais intensa na camada suprabasal; B – Queilite actínica – expressão mais intensa do que no grupo controle, principalmente na camada suprabasal, no entanto também pode ser observada no terço médio; C – Carcinoma espinocelular de lábio – comparando com os demais grupos, a expressão na camada basal mostrou ser ainda mais intensa e aumentava diretamente proporcional a desorganização epitelial. (Imunohistoquímica – anti-Ki-67 200x).....

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição das características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, 2008 e 2013..... **58**
- Tabela 2** - Distribuição da média de expressão de β -catenina no grupo controle e queilite actínica de acordo com a intensidade da displasia epitelial. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, 2008 e 2013..... **65**
- Tabela 3** - Distribuição da média de expressão de ciclina D1 e Ki-67 no grupo controle e queilite actínica de acordo com a intensidade da displasia epitelial. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, 2008 e 2013..... **67**
- Tabela 4** - Distribuição da média de expressão de β -catenina no grupo controle, queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, 2008 e 2013..... **77**
- Tabela 5** - Distribuição da média de expressão de ciclina D1 e Ki-67 no grupo controle, queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, 2008 e 2013..... **79**
- Tabela 6** - Correlação entre a média de expressão de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 entre os grupos controle, queilite actínica e carcinomas. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, 2008 e 2013..... **88**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
°C	grau Celsius
<	menor
=	igual
+	positivo
-	negativo
nº	número
µm	micrometro
CEC	carcinoma espinocelular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CIS	carcinoma in situ
DAB	<i>Diaminobenzidine Tetrahydrochloride</i>
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
HE	hematoxilina e Eosina
H₂O₂	peróxido de Hidrogênio
h	hora
Ki 67	Kiel 67
MIB 1	antígeno Ki-67
mL	mililitro
mM	Milimol
p	nível de significância
PAS	ácido periódico de Schiff
PBS	phosphate buffered saline (solução salina fosfatada tamponada)
pH	concentração hidrogeniônica
QA	queilite actínica
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SP	Estado de São Paulo
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	β -CATENINA	28
2.1.1	Expressão de β -catenina em carcinoma espinocelular bucal	31
2.2	CICLINA D1	34
2.2.1	Correlação entre a superexpressão de ciclina D1 e via de sinalização de Wnt	35
2.3	KI-67	37
3	PROPOSIÇÃO	39
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	43
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	45
4.2	REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS	45
4.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	46
4.3.1	Graduação histopatológica da displasia epitelial	46
4.3.2	Graduação histopatológica dos carcinomas espinocelulares de lábio	47
4.3.3	Método imunohistoquímico	48
4.3.4	Avaliação imunohistoquímica	49
4.3.4.1	Avaliação imunohistoquímica de β -Catenina	50
4.3.4.2	Avaliação imunohistoquímica de ciclina D1 e do anticorpo anti-Ki-67	52
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4.5	AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS	52
4.6	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	53

5	RESULTADOS	55
5.1	CASUÍSTICA	57
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	57
5.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	59
5.3.1	Classificação histopatológica das queilites actínicas	59
5.3.2	Classificação histopatológica dos carcinomas espinocelulares de lábio	59
5.3.3	Expressão imunohistoquímica de β -catenina	63
5.3.4	Expressão imunohistoquímica de ciclina D1 e Ki-67	63
5.3.5	Comparação da expressão de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 em queilites actínicas com displasia epitelial leve, moderada e intensa	64
5.3.6	Comparação da expressão de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 em queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio	75
5.3.7	Correlação entre a expressão média de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 em queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio	87
6	DISCUSSÃO	89
7	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXO	115

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer bucal permanece como uma neoplasia maligna de grande incidência em todo o mundo, incluindo o Brasil (INCA, 2016). Estima-se que de 10 a 20% das lesões bucais potencialmente malignas progridam para carcinomas espinocelulares de boca (RAMASUBRAMANIAN et al., 2013; YANG et al., 2013). Dentre estas lesões potencialmente malignas, a queilite actínica tem sido considerado um fator importante na ocorrência do câncer de lábio (SCHUSSEL; PINTO JR, MARTINS, 2011; SOUZA et al., 2011).

Diante disso, atualmente, um dos objetivos da pesquisa científica nesta área consiste na busca de biomarcadores preditivos que possam auxiliar na definição da probabilidade de progressão das lesões potencialmente malignas para o câncer de boca, e ainda sejam capazes de identificar os principais agentes moleculares envolvidos na carcinogênese de um determinado tipo de tumor (YU et al., 2005; SANTORO et al., 2014).

Está bem estabelecido que, com frequência, a queilite actínica, assim como o carcinoma espinocelular de lábio, são causados pela exposição exacerbada à radiação ultravioleta do tipo B (UVB) (MENTA SIMONSEN NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; WOOD et al., 2011). Os raios UVB promovem alterações genéticas que podem provocar mutações no gene epitelial supressor de tumor, p53, induzindo a desregulação das suas funções, permitindo assim que os queratinócitos alterados consigam prosseguir e propagar-se. Ao continuarem sofrendo exposição aos raios UVB, esses queratinócitos instáveis genomicamente, estão susceptíveis às alterações genéticas e moleculares adicionais que podem desencadear o processo de malignização (LEFFELL, 2000; ACKERMAN; MONES, 2006; HORTA et al., 2007; ROSSI; MOR; LOTT, 2007; WOOD et al., 2011).

Além das alterações provocadas no gene p53, a radiação ultravioleta do tipo B exacerbada pode causar várias outras alterações genéticas que também estão envolvidas no desenvolvimento do câncer (SHAH; DOHERTY; ROSEN, 2010; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012).

Um exemplo disso é representado pela ativação da via de sinalização de Wnt causando alteração no padrão de expressão de β -catenina, o que tem sido frequentemente identificado em diversos tumores malignos (TANAKA et al., 2003; MAHOMED; ALTINI; MEER, 2007; ROSADO et al., 2013; SOARES et al., 2015). No entanto, implicação desta via Wnt nos carcinomas espinocelulares bucais ainda é considerada pouco explorada (SANTORO et al., 2014).

A β -catenina consiste em uma proteína que contém múltiplas funções, as quais variam de acordo com sua localização celular (JAMIESON; SHARMA; HENDERSON, 2012; GONZALEZ-MOLES et al., 2014b). Quando presente na membrana celular forma um complexo com a E-caderina responsável pela adesão celular, contribuindo com a formação da estrutura do epitélio escamoso estratificado da mucosa oral normal. Quando presente no citoplasma, na ausência da ativação da via de sinalização de Wnt, a β -catenina é degradada por um complexo multiprotéico formado por APC, Axin e GSK3 β . Porém, quando ocorre alguma mutação genética que ativa a via de sinalização de Wnt, a β -catenina deixa de ser degradada e acumula-se no citoplasma (MACDONALD; TAMAI; HE, 2009; SCHUSSEL; PINTO JÚNIOR; MARTINS, 2011; TIAN et al., 2011). Dessa forma a β -catenina pode translocar-se ao núcleo e atuar na transcrição de oncogenes envolvidos no aumento da proliferação celular, como a ciclina D1 (IWAI et al., 2005; ODAJIMA et al., 2005; ISHIDA et al., 2007; GONZALEZ-MOLES et al., 2014b).

A ciclina D1 é um regulador do ciclo celular que conduz as células de G1 para a fase S modulando a atividade de fatores de transcrição e, alterações em sua função, são relacionadas com o processo da carcinogênese (FERRAZZO et al., 2009; LILL et al., 2015). Uma investigação recente demonstrou, em lesões orais displásicas, um aumento significativo da expressão de ciclina D1 a medida que aumentava a intensidade da displasia epitelial, sugerindo sua utilização como marcador de prognóstico e poderia auxiliar no sistema de classificação da displasia epitelial oral (RAMASUBRAMANIAN et al., 2013).

Nas últimas décadas, vem sendo sugerido que a expressão alterada de β -catenina, que envolve perda da expressão membranosa e presença de expressão citoplasmática e nuclear, e ainda a superexpressão de ciclina D1, poderiam estar associadas diretamente à transformação maligna, perda de diferenciação celular, maior proliferação, fenótipo mais agressivo, aumento da invasão do tumor e

consequentemente pior prognóstico para os pacientes com câncer de boca (TANAKA et al., 2003; LAXMIDEVI et al., 2010; SCHUSSEL; PINTO JÚNIOR; MARTINS, 2011).

No entanto, embora existam algumas evidências da implicação das alterações nos níveis de β -catenina nas vias de regulação da ciclina D1 em carcinomas espinocelulares bucais, nenhum estudo foi encontrado avaliando a expressão destes marcadores conjuntamente em carcinomas espinocelulares de lábio e/ou em queilites actínicas.

Portanto, neste estudo pretende-se investigar a expressão de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 como biomarcadores preditivos para o câncer de lábio e ainda verificar se a via de sinalização de Wnt tem participação relevante no processo de transformação maligna do lábio, visando contribuir com o conhecimento da carcinogênese labial.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

O carcinoma espinocelular de lábio pode se originar de uma lesão cancerizável conhecida como queilite actínica (SCHUSSEL; PINTO JR; MARTINS, 2011; SOUZA et al., 2011). Sabe-se que a presença de displasia epitelial na queilite actínica aumenta o risco de uma transformação maligna para o carcinoma de lábio, e por isso, a classificação da displasia epitelial deve ser a mais precisa possível (KUJAN et al., 2007; WARNAKULASURIYA et al., 2008, SHAH; DOHERTY; ROSEN, 2010).

No entanto, segundo Warnakylasuriya et al. (2008), embora a maioria dos patologistas reconheça e adote os critérios recomendados pela Organização Mundial de Saúde (GALE et al., 2005) para graduar a displasia epitelial, ainda existe uma grande variabilidade na sua classificação. Além dessa subjetividade observada na classificação da displasia epitelial das queilites actínicas, embora o carcinoma espinocelular de lábio seja considerado uma lesão de prognóstico bom quando comparado com outros tumores da região da cabeça e pescoço, pode apresentar metástases em aproximadamente 5% dos pacientes (BILKAY et al., 2003; KORNEVS et al., 2005; HASSON, 2008; RENA et al., 2014). Isso reforça a necessidade de explorar melhor os eventos envolvidos na carcinogênese de lábio (YU et al., 2005; BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006; SPEIGHT, 2010; SANTORO et al., 2014).

Um dos objetivos da pesquisa científica consiste na identificação dos principais agentes moleculares envolvidos na carcinogênese de um determinado tipo de tumor, possibilitando assim, auxiliar na definição da probabilidade de malignização de lesões cancerizáveis, como a queilite actínica (YU et al., 2005; SANTORO et al., 2014). Assim sendo, a caracterização de moléculas alteradas envolvidas na carcinogênese é essencial para compreender os mecanismos moleculares da progressão tumoral contribuindo na identificação de biomarcadores preditivos para um determinado tipo de câncer (BARAKAT, 2015).

Recentemente, em uma investigação de nosso grupo de pesquisa, verificamos a relação da expressão das citoqueratinas (CK10 e CK13) com o índice de proliferação celular, determinado pelo Ki-67, em carcinomas espinocelulares de lábio e em queilites actínicas com diferentes graus de displasia. Os resultados mostraram que há uma perda de expressão de CK10 nas áreas displásicas das queilites actínicas, assim como nos carcinomas espinocelulares do lábio. Além disso, o índice de proliferação celular, determinado pelo Ki-67, foi correlacionado diretamente com a intensidade da displasia epitelial. Portanto, baseado nestes resultados, sugerimos que a expressão de CK10 e o índice de proliferação celular, determinado pelo Ki-67, podem ajudar a identificar as queilites actínicas com maior risco de transformação maligna na região labial (GARCIA et al., 2016).

Continuando nesta mesma linha de pesquisa e diante dos poucos estudos existentes na literatura, incluímos, no presente estudo, alguns outros biomarcadores visando contribuir com o entendimento da carcinogênese labial bem como da transformação maligna em queilites actínicas com diferentes graus de displasia epitelial.

2.1 β -CATENINA

A β -catenina é uma proteína que contém múltiplas funções, as quais variam de acordo com sua localização celular (JAMIESON; SHARMA; HENDERSON, 2012; GONZALEZ-MOLES et al., 2014b).

Em situações de normalidade, quando presente na membrana celular a β -catenina forma um complexo com a E-caderina responsável pela adesão celular, contribuindo com a formação da estrutura do epitélio escamoso estratificado da mucosa oral normal (MACDONALD; TAMAI; HE, 2009; SCHUSSEL; PINTO JÚNIOR; MARTINS, 2011; TIAN et al., 2011). A fosforilação de E-caderina e β -catenina pela Ser/Thr quinase CK11 estabiliza este complexo (TIAN et al., 2011). Entretanto, a ocorrência de outros eventos de fosforilação pode desestabilizar esse complexo β -catenina+E-caderina, como por exemplo, a tirosina 65, 48A ou 142, ou ainda o fator de crescimento TGF- β 1, causando a ruptura desse complexo e consequentemente, a adesão celular, aumentando assim, a disponibilidade de β -

catenina no citoplasma (GILLES et al., 2003; KALLURI; WEINBERG, 2009; GONZALEZ-MOLES et al., 2014b).

Quando presente no citoplasma, a β -catenina passa a participar da via de sinalização de Wnt e consequentemente irá também atuar na transcrição genética (MACDONALD; TAMAI; HE, 2009; SCHUSSEL; PINTO JÚNIOR; MARTINS, 2011; TIAN et al., 2011).

A via de sinalização de Wnt está associada à diferenciação e proliferação celular, sendo ativada quando um receptor de baixa densidade como LRP6 forma com o co-receptor frizzled o complexo Wnt-Fz-LRP6 (JAMIESON; SHARMA; HENDERSON, 2012). Este complexo vai então recrutar o complexo Axin e consequentemente vai impedir que ocorra a fosforilação da β -catenina. Pois, na sua ausência, β -catenina é fosforilada por um complexo multiprotéico formado pelo Axin, APC, CK1 e GSK3 (Figura 1A) (HENDERSON; FAGOTTO, 2002; MOON et al., 2004; ATCHA et al., 2007; HOPPLER; KAVANAGH, 2007; MACDONALD; TAMAI; HE, 2009; GONZALEZ-MOLES et al., 2014b). No entanto, como o complexo Axin será recrutado pelo complexo Wnt-Fz-LRP6, a β -catenina irá se acumular no citoplasma e se translocar para o núcleo onde irá atuar na transcrição genética (MOON et al., 2004; MACDONALD; TAMAI; HE, 2009), conforme descrito na Figura 1B.

Quando presente no núcleo, para que a β -catenina atue como um fator de transcrição é necessário que se forme um complexo com TCF/LEF (IWAI et al., 2005; ARCE; YOKOYAMA; WATERMAN, 2006). Antes de ocorrer essa associação o TCF encontra-se ligado a um receptor Groucho, que promove a desacetilação das histonas e a compactação da cromatina, reprimindo a expressão genética. Na presença da β -catenina no núcleo, esta vai se ligar ao TCF e deslocar o receptor Groucho, que em conjunto com outros co-ativadores, relaxa a cromatina e permite a expressão genética (ARCE; YOKOYAMA; WATERMAN, 2006; HOPPLER; KAVANAGH, 2007).

Mas para que isso ocorra e a β -catenina passe a atuar na transcrição dos genes é necessário que algo errado ocorra e induza os receptores a ativarem a via de sinalização de Wnt. Pois em condições de normalidade, algumas proteínas como a proteína relacionada com frizzled (sFRP) e o fator inibidor de Wnt (WiFS) se ligam e antagonizam a via Wnt (BOVOLENTA et al., 2008).

Fonte: GONZALEZ-MOLES et al., 2014b.

Figura 1 - Na ausência da via de sinalização de Wingless (Wnt) **(A)** β-catenina é fosforilada por um complexo multiprotéico (Axin, APC, CK1 e GSK3). A via de sinalização de Wnt é ativada **(B)** quando um receptor de baixa densidade como LRP5/6 forma com o co-receptor frizzled o complexo Wnt-Fz-LRP5/6. Este complexo vai então recrutar o complexo Axin e consequentemente vai impedir que ocorra a fosforilação da β-catenina. Logo, esta proteína irá se acumular no citoplasma e se translocar para o núcleo onde irá formar um complexo com TCF/LEF, o qual irá atuar na transcrição genética.

2.1.1 Expressão de β -catenina em carcinoma espinocelular bucal

Após três décadas desde a descoberta da via de sinalização de WNT como uma via fundamental evolutivamente houve, durante a última década, uma rápida expansão na compreensão do circuito regulador e da complexidade desta via, embora muitos detalhes envolvidos nos aspectos essenciais dos mecanismos de sinalização continuem totalmente não elucidados (YANG et al., 2016).

Dentre os mecanismos subjacentes à via de sinalização de Wnt sob condições patológicas já foi confirmado que as alterações estruturais e funcionais de β -catenina podem promover a progressão tumoral através da promoção da transcrição de oncogenes ligados à desregulação da via de WNT ou por meio do aumento da mobilidade celular e da capacidade invasiva devido à perda da função de adesão celular (GONZALEZ MOLES et al., 2016).

A maioria dos estudos avaliando a expressão de β -catenina em carcinomas espinocelulares orais investiga seu comportamento junto a E-caderina no complexo responsável pela adesão celular (TANAKA et al., 2003; URAGUCHI et al., 2004; MAHOMED; ALTINI; MEER, 2007; LOPES et al., 2009; KAUR et al., 2013; ROSADO et al., 2013; BALASUNDARAM et al., 2014; HANEMANN et al., 2014; ZAID, 2014; SOARES et al., 2015). Pois, sabe-se que as perturbações nas moléculas de adesão celular estão ligadas às alterações no complexo de E-caderina/ β -catenina, o qual desempenha um papel importante na invasão celular e metástase. Essas alterações no complexo da adesão celular são representadas pela perda de expressão membranosa de β -catenina e de E-caderina nos primeiros eventos da carcinogênese bucal (KAUR et al., 2013).

Desse modo, alguns autores sugeriram que a expressão membranosa reduzida de β -catenina estaria relacionada com o alto grau de indiferenciação celular destes tumores malignos (LOPES et al., 2009; ZAID, 2014). Além disso, outros estudos reforçaram que β -catenina também pode ser um bom biomarcador para a identificação de metástases em pacientes com carcinoma espinocelular bucal. (TANAKA et al., 2003; MAHOMED; ALTINI; MEER, 2007; ROSADO et al., 2013; SOARES et al., 2015). No entanto, segundo Balasundaram et al. (2014) e Hanemann et al. (2014), as expressões dessas moléculas de adesão não são suficiente para prever ocorrência ou não de metástase ganglionar, bem como não

são capazes de mostrar valor significativo no prognóstico dos carcinomas espinocelulares orais.

Como já foi mencionado anteriormente, além dessa participação de β -catenina na progressão tumoral por meio do aumento da mobilidade celular e da capacidade invasiva devido à perda da função de adesão celular, acredita-se que a β -catenina também pode promover a progressão tumoral por meio da promoção da transcrição de oncogenes ligados à desregulação da via de WNT (GONZALEZ MOLES et al., 2016).

Desse modo, estudos mais recentes passaram a investigar a expressão de β -catenina nas diferentes localizações, membrana, citoplasma e núcleo, na carcinogênese oral (ISHIDA et al., 2007; LO MUZIO et al., 2009; LIU; MILLAR, 2010; KAUR et al., 2013; ROSADO et al., 2013; ZAID, 2014; REYS et al., 2015; SILVA et al., 2015; GONZALEZ MOLES et al., 2016).

Dentre esses, alguns avaliaram a expressão de β -catenina em leucoplasias orais com displasia epitelial e observaram que na presença da displasia houve perda da expressão membranosa e a expressão passou a ser citoplasmática e/ou nuclear, sendo a β -catenina considerada um bom marcador para displasia epitelial (ISHIDA et al., 2007; CAI et al., 2008; LO MUZIO et al., 2009; LOPES et al., 2009; LAXMIDEVI et al., 2010; LIU; MILLAR, 2010; KAUR et al., 2013; REYS et al., 2015; SILVA et al., 2015).

Ao avaliar a expressão de β -catenina em carcinomas espinocelulares orais, foi sugerido que a expressão membranosa reduzida, assim como, a expressão de β -catenina no citoplasma e/ou no núcleo estaria envolvida com o comportamento tumoral mais agressivo, consequentemente com um pior prognóstico para os pacientes (CAI et al., 2008; LOPES et al., 2009; LAXMIDEVI et al., 2010; ROSADO et al., 2013; ZAID, 2014; REYS et al., 2015; GONZALEZ MOLES et al., 2016).

Dentre os estudos publicados na literatura, apenas três (XAVIER et al., 2009; SCHUSSEL; PINTO JÚNIOR; MARTINS, 2011; BARAKAT, 2015) avaliaram a expressão de β -catenina em carcinomas espinocelulares de lábio. Dois destes (XAVIER et al., 2009; SCHUSSEL; PINTO JÚNIOR; MARTINS, 2011) avaliaram também a expressão de β -catenina em queilites actínicas.

Xavier et al. (2009) investigaram a expressão de β -catenina, entre outros marcadores (WNT-5A e metaloproteínases da matriz expressão) em 21 queilites actínicas e 51 carcinomas espinocelulares de lábio; Os resultados obtidos mostraram que a maioria das queilites actínicas (61,90%) demonstrou um padrão de expressão de β -catenina membranoso-citoplasmático, enquanto que um número considerável de carcinomas espinocelulares de lábio (29,41%) revelou um padrão de expressão apenas citoplasmático, sugerindo que a via de sinalização de Wnt/ β -catenina pode estar envolvida nos eventos iniciais da transformação maligna nas queilites actínicas

Schussel, Pinto Júnior, Martins (2011) avaliaram a expressão de β -catenina em (n=12) e em queilites actínicas com displasia epitelial (n=35). Os resultados mostraram que todos os espécimes avaliados apresentaram expressão membranosa positiva; 85% dos casos de queilite actínica apresentaram expressão citoplasmática e 22% apresentaram expressão nuclear. Quando divididas de acordo com a intensidade da displasia epitelial, foi observada que à medida que aumentava a intensidade de displasia, a expressão membranosa se tornava mais fraca e a expressão citoplasmática e nuclear tornavam-se mais intensas. Além disso, quanto maior a intensidade da displasia, mais camadas epiteliais apresentavam expressão positiva. Nos carcinomas de lábio a expressão foi membranosa e citoplasmática em 83% dos casos, sendo mais intensa nas camadas basais e nas áreas adjacentes. As ilhotas e áreas centrais apresentaram expressões mais fracas. Com base nos resultados obtidos, os autores sugeriram que a expressão β -catenina é alterada na presença de displasia epitelial, e está diretamente relacionada com o grau das alterações epiteliais.

Barakat (2015) analisou a expressão de β -catenina em carcinomas espinocelulares de lábio de diferentes graus de malignidade. Foram utilizados 29 espécimes de carcinomas de lábio, sendo 11 bem diferenciados, 9 moderadamente diferenciados e 9 pouco diferenciados. Os resultados mostraram que a expressão alterada de β -catenina apareceu em 58,6% das células, sendo em 29% das células dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados, em 63% das células dos carcinomas moderadamente diferenciados e em 86% das células dos carcinomas pouco diferenciados. A expressão citoplasmática foi observada em 14,7% das células, sendo em 7,2% das células dos carcinomas espinocelulares bem

diferenciados, em 22,1% das células dos carcinomas moderadamente diferenciados e em 14,9% das células dos carcinomas pouco diferenciados. Já a expressão nuclear apareceu em apenas 5% das células, sendo em 0,1% das células dos carcinomas espinocelulares bem diferenciados, em 5,5% das células dos carcinomas moderadamente diferenciados e em 9,6% das células dos carcinomas pouco diferenciados. Com base nesses resultados, os autores acreditam que a expressão anormal de β -catenina é um fator significativo em predizer o grau histológico de malignidade dos carcinomas espinocelulares de lábio, o que parece refletir o papel estrutural e a associação de β -catenina na progressão tumoral.

2.2 CICLINA D1

A ciclina D1 é uma proteína codificada pelo gene CCND1 localizado no cromossomo 11q¹³, a qual foi descrita como um oncogene em 1991 por Motokura, que observou que o aumento da ciclina desregula o ciclo celular e contribui para gênese do tumor (RAMASUBRAMANIAN et al., 2013). Pois, a ciclina D1 é um regulador do ciclo celular que conduz as células de G1 para a fase S. Esta proteína forma complexos com função de fosforilar a proteína do retinoblastoma, logo ocorre a liberação de um fator de transcrição que leva à progressão da fase G1 para a fase S. Além disso, a ciclina D1 funciona como reguladora da transcrição, modulando a atividade de fatores de transcrição. Acredita-se que essas duas funções da ciclina D1 podem contribuir no processo da carcinogênese de alguns tipos de tumor maligno (FERRAZZO et al., 2009; LILL et al., 2015).

Ramasubramanian et al. (2013) avaliaram a expressão de ciclina D1 em lesões orais displásicas. A amostra foi constituída por 30 leucoplasias com displasia epitelial leve, moderada e intensa. Os resultados mostraram um aumento significativo na expressão de ciclina D1 à medida que aumentava a intensidade da displasia epitelial. Logo, os autores sugeriram que a ciclina D1 pode ser usada como marcador prognóstico auxiliando no sistema de classificação da displasia epitelial.

Avaliando a expressão de ciclina D1 em carcinomas espinocelulares de lábio os poucos estudos publicados na literatura observaram uma maior expressão de ciclina D1 nos carcinomas de lábio em estágios mais avançados e/ou com

potencial metastático (FABBROCINI et al., 2000; RODOLICO et al., 2005). Consequentemente a baixa expressão de ciclina D1 foi correlacionada com a maior sobrevida livre da doença nos pacientes com câncer de lábio (JAWORSKA et al., 2008).

2.2.1 Correlação entre a superexpressão de ciclina D1 e via de sinalização de Wnt

A superexpressão de ciclina D1 pode está associada à ativação da via de sinalização de Wnt, na qual os níveis anormais de β -catenina no núcleo podem promover a ativação dos genes da ciclina D1, que resulta na sua superexpressão (DO; PARK; LIM, 2004; SHIRATSUCHI et al., 2007).

No entanto, alguns estudos que avaliaram a existência dessa associação em carcinomas espinocelulares orais observaram que não foi encontrada uma associação significativa entre a alteração de expressão de β -catenina e a superexpressão de ciclina D1, sugerindo sua participação em uma outra via de sinalização que não seja a via de Wnt (DO; PARK; LIM, 2004; ODAJIMA et al., 2005; SATHYAN; NALINAKUMARI; KANNAN, 2007; VAN DER WEYDEN et al., 2011; FU; FENG, 2015; MISHRA; NAGINI; RANA, 2015).

Segundo Sales et al. (2014) a expressão de β -catenina e ciclina D1 ocorre por uma combinação de eventos independentes, onde a superexpressão de ciclina D1 conduz a um aumento da proliferação, provavelmente orquestrada pela fosforilação de Akt .

Entretanto, não foi encontrado nenhum estudo na literatura avaliando essa associação entre β -catenina e ciclina D1 em carcinomas espinocelulares de lábio e em queilites actínicas com displasia epitelial.

Mas sabe-se que além das vias de sinalização, outras alterações como a ampliação do gene ciclina D1 (CCND1), polimorfismos e outros eventos mutacionais também podem estar envolvidos na superexpressão de ciclina D1 (SANTARIUS et al., 2010).

Polimorfismos envolvendo o gene CCND1 também têm sido investigados, sendo o polimorfismo G/A870 o mais pesquisado. Pois, o alelo A870, o qual pode ou não estar presente, codifica uma proteína conhecida como ciclina D1b, uma isoforma de ciclina D1, que tem sido associada com o aumento do risco de câncer (WANG et al., 2014). Após realizarem uma meta-análise sobre a influência do polimorfismo G/A870 na expressão de ciclina D1 em carcinomas orais, Wang et al. (2014) relataram que o polimorfismo G/A870 e a superexpressão de ciclina D1 estão correlacionados com a susceptibilidade de câncer bucal na população asiática.

Um outro mecanismo que tem despertado a atenção dos investigadores é a mutação de micro RNAs que podem ter como alvo o gene CCND1 ou outros genes que expressam proteínas reguladoras da atividade transcripcional de CCND1. No entanto, há poucos estudos com este foco em carcinomas espinocelulares orais (JIA et al., 2013; CHI, 2015; JIA et al., 2015).

De acordo com o estudo de Jia et al. (2013) em carcinomas espinocelulares de língua a redução da expressão de miR-195 foi associada com o tamanho e o estágio clínico mais avançados dos tumores e com uma superexpressão dos genes alvos, ciclina D1 e Bcl-2. Logo, esses autores afirmaram que o miR-195 pode ser considerado um bom fator prognóstico para os carcinomas espinocelulares de língua.

Em outro estudo, também em carcinomas espinocelulares de língua, Jia et al. (2015) mostraram que a superexpressão do miR-375 inibia significativamente a proliferação celular, sendo esta inversamente proporcional a expressão de ciclina D1 e Sp1, sugerindo que o miR-375 também é um bom fator prognóstico.

Chi (2015) avaliaram a expressão do miR-194 em carcinomas espinocelulares de língua, tecido epitelial não tumoral adjacente e em epitélio normal de língua e observaram que este micro RNA atuou como um supressor desses tumores, reduzindo o potencial de algumas vias como, PI3K/AKT/FoxO3, logo resultando também na diminuição significativa da expressão de ciclina D1. Desse modo, os autores sugerem que o miR-194 pode atuar como um potencial alvo terapêutico para pacientes portadores de carcinomas espinocelulares de língua.

2.3 KI-67

Além da ciclina D1, outras proteínas reguladoras do ciclo celular, como o Ki-67 têm sido usadas não somente para distinguir tumores malignos de outras lesões, como também para prever o seu comportamento biológico (MARTÍNEZ et al., 2005).

Um esquema bem explicativo do padrão de proliferação do epitélio oral normal foi descrito por Gonzales-Moles e colaboradores (GONZALES-MOLES; SCULLY; RUIZ-AVILA, 2012; GONZALES-MOLES et al., 2014a) e encontra-se ilustrado na Figura 2. Seguindo este modelo, ocorre um padrão de divisão celular assimétrica no epitélio oral, sendo as células da camada basal responsáveis pela renovação epitelial, pois, encontram-se em um processo contínuo de proliferação. Cada célula progenitora divide-se assimetricamente em uma célula-filha com capacidade idêntica de proliferação e em uma célula transitória com um número limitado de divisões. A célula transitória é capaz de amplificar a divisão em três e cinco vezes até que todas as células filhas se diferenciem. Esse padrão hierárquico produz três camadas no epitélio oral: a camada basal; parabasal e suprabasal, onde as células sofrem diferenciação terminal (Figura 2). Portanto, acredita-se que essa divisão assimétrica do epitélio seja um dos principais mecanismos de proteção anti-tumoral, pois, a máxima proliferação e o maior risco de mutação são suportados pelas células transitórias, que irão passar por diferenciação terminal e descamação (GONZALES-MOLES; SCULLY; RUIZ-AVILA, 2012; GONZALES-MOLES et al., 2014a).

Quando o epitélio perde esse mecanismo de proteção, como no caso de lesões malignas e/ou cancerizáveis, o padrão de proliferação difere da configuração assimétrica observada no epitélio oral normal (GONZALES-MOLES et al., 2014a) o que tem sido confirmado em alguns estudos que avaliaram o índice de proliferação celular determinado pelo Ki-67 nas camadas suprabasais do epitélio dessas lesões (GONZALES-MOLES et al., 2000; TAKEDA et al., 2006; GONZALES-MOLES et al., 2010; GARCIA et al., 2016).

Assim, estes estudos, inclusive um deles realizado por nosso grupo de pesquisa, observaram que a intensidade da expressão do Ki-67 na camada suprabasal está diretamente relacionada com o grau de displasia epitelial. Logo, o

aumento da proliferação das células epiteliais na camada suprabasal pode indicar que há um risco dessa área sofrer malignização. Portanto, a distribuição das células em proliferação nas camadas epiteliais podem fornecer informações úteis para a classificação da displasia epitelial (GONZALES-MOLES et al., 2000; TAKEDA et al., 2006; GONZALES-MOLES et al., 2010; GARCIA et al., 2016).

Fonte: Adaptado de GONZALES-MOLES et al., 2014a.

Figura 2 - Modelo de divisão celular assimétrica do epitélio oral normal. Cada célula progenitora divide-se assimetricamente em uma célula-filha com capacidade idêntica de proliferação e em uma célula transitória com um número limitado de divisões. A célula transitória é capaz de amplificar a divisão em três e cinco vezes até que todas as células filhas alcancem a diferenciação terminal.

Com base nessa revisão de literatura, considerando que nenhum estudo foi encontrado avaliando conjuntamente a expressão de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 em carcinomas espinocelulares de lábio e queilites actínicas com displasia epitelial, propusemos com o presente estudo contribuir com a identificação de biomarcadores preditivos para carcinogênese labial.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A partir da análise de 45 queilites actínicas com diferentes graus de displasia epitelial, de 30 carcinomas espinocelulares de lábio inferior e 15 epitélios orais normais, imunomarcados com β -catenina, ciclina D1 e Ki-67, propôs-se:

- analisar o padrão de expressão imunohistoquímica de β -catenina nos diferentes tipos de epitélio normal, displásico e neoplásico;
- investigar se há correlação entre a expressão de β -catenina e o grau de displasia epitelial e de diferenciação tumoral;
- verificar se existe correlação entre a expressão citoplasmática/nuclear de β -catenina e a expressão de ciclina D1;
- analisar a expressão de ciclina D1 e Ki-67 nos diferentes tipos de epitélio e observar se existe correlação entre as expressões desses marcadores e o grau de displasia epitelial e de diferenciação tumoral;
- Identificar se a via de sinalização Wnt tem participação relevante na carcinogênese labial e contribuir com a identificação de biomarcadores preditivos para esta neoplasia em pacientes portadores de lesões potencialmente malignas, como as queilites actínicas.

4 Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

A população de estudo foi constituída por 45 pacientes portadores de queilite actínica com displasia epitelial submetidos ao tratamento no Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de 2006 a 2011 e por 30 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior submetidos ao tratamento no Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, entre 2008 e 2013. Parte desta amostra foi previamente utilizada por Garcia (2013). Também foram utilizadas como controle, 15 amostras de epitélio oral normal oriundas de mucocelos e hiperplasias fibrosas inflamatórias obtidas de pacientes tratados no Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, entre 2008 e 2013.

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados para seleção das amostras:

- pacientes com queilite actínica com e sem displasia e/ou câncer de lábio, com diagnóstico confirmado por exame histopatológico;
- pacientes submetidos a cirurgia como tratamento inicial;
- fragmentos de tumor suficiente para análise microscópica;
- disponibilidade dos respectivos blocos de parafina.

4.2 REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS

As informações clínicas e microscópicas, referentes aos pacientes e à peça cirúrgica, foram obtidas a partir das requisições de registro das biópsias pertencentes ao Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de

Botucatu, UNESP e dos laudos e/ou prontuários obtidos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha. Estes registros incluíam clinicamente, a identificação do paciente, gênero, idade, diagnóstico microscópico, presença ou não de recidiva e condição atual do paciente, quando presente.

4.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

No grupo controle, o epitélio oral normal, algumas vezes hiperplásico, foi avaliado como um todo. Nas queilites actínicas o epitélio também foi avaliado como um todo, no entanto, ressaltando as áreas displásicas. Nos carcinomas espinocelulares de lábio o epitélio foi avaliado na região do *front* de invasão tumoral.

4.3.1 Graduação histopatológica da displasia epitelial

A classificação das alterações epiteliais do epitélio do grupo controle e das queilites actínicas foi realizada de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde, (GALE et al. 2005), baseados no grau de queratinização, no pleomorfismo nuclear e na atividade mitótica das células epiteliais, como descrito a seguir:

- **Hiperplasia:** aumento do número de células da camada espinhosa (acantose) e/ou na basal, porém sem atipia celular;
- **Displasia leve (grau I):** alteração da arquitetura epitelial limitada ao terço inferior do epitélio com presença de atipia celular;
- **Displasia moderada (grau II):** alteração da arquitetura epitelial estendendo ao terço médio com atipia celular;
- **Displasia intensa (grau III) ou carcinoma in situ:** alterações da arquitetura epitelial atingindo toda ou quase toda espessura do epitélio, associadas à acentuada atipia celular com presença de figuras de mitose e/ou mitoses atípicas.

Foram consideradas alterações da arquitetura epitelial:

- ❖ estratificação irregular do epitélio;
- ❖ perda da polaridade das células basais;
- ❖ cristas epiteliais em forma de gota;
- ❖ aumento do número de figuras mitóticas;
- ❖ mitoses superficiais atípicas;
- ❖ queratinização prematura de células individuais (disqueratose);
- ❖ pérolas de queratina no interior das cristas epiteliais.

Foram consideradas alterações celulares no epitélio:

- ❖ alteração no tamanho do núcleo (anisonucleose);
- ❖ alteração na forma do núcleo (pleomorfismo nuclear);
- ❖ alteração no tamanho da célula (anisocitose);
- ❖ alteração na forma da célula (pleomorfismo celular);
- ❖ alteração na relação núcleo/citoplasma;
- ❖ núcleo com tamanho aumentado;
- ❖ figuras de mitose atípicas;
- ❖ aumento no número e tamanho dos nucléolos.

4.3.2 Graduação histopatológica dos carcinomas espinocelulares de lábio

A classificação histopatológica de malignidade tumoral utilizada foi a proposta pela Organização Mundial de Saúde, (BARNES et al. 2005), a qual se baseia no grau de diferenciação celular e permite o agrupamento dessa neoplasia maligna em três categorias:

- **Carcinomas espinocelulares bem diferenciados:** arquitetura tecidual se assemelha a um padrão normal de epitélio escamoso.

- **Carcinomas espinocelulares moderadamente diferenciados:** apresentavam certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca queratinização.
- **Carcinomas espinocelulares pouco diferenciados:** predomínio de células epiteliais imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima queratinização.

A análise microscópica das alterações epiteliais e a graduação de malignidade foram realizadas por três examinadores (NGG, DTO, MAGM) sem o conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes, utilizando-se um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 Plus, Zeiss), contendo uma objetiva de 20X.

4.3.3 Método imunohistoquímico

Nove cortes microscópicos de 4 µm de espessura foram obtidos de cada espécime, os quais foram fixados em formalina e adequadamente preparados para coloração imuno-histoquímica.

A marcação imunohistoquímica da amostra seguiu o protocolo utilizado no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, como descrito a seguir:

Inicialmente foram realizados os processos de desparafinização e hidratação dos cortes histológicos. A desparafinização foi realizada em estufa a 65°C por 24 horas. A hidratação foi realizada por meio da imersão dos cortes por três vezes em xilol a 60°C por 10 minutos cada e, em seguida, em quatro cubas de álcool absoluto por 30 segundos cada.

O método imunohistoquímico foi realizado automaticamente por meio dos equipamentos Autostainer Link (Dako, Carpintería, CA, USA) e reagentes In Vision™ Flex (K8002, Dako) de acordo com as instruções do fabricante.

Neste sistema, após terem sido realizadas desparafinização e hidratação, segue-se com uma recuperação antigênica induzida por calor. Sendo, a reprodutibilidade deste processo assegurada através do carregamento do suporte da

lâmina inteira, garantindo assim um aquecimento de todas as secções idênticas em cada ciclo.

Os anticorpos primários utilizados foram:

- ✓ anticorpo Monoclonal de Camundongo Anti-Humano β -Catenina, Clone β -Catenin-1 (Dako, California, USA), diluição 1:100;
- ✓ anticorpo Monoclonal de Coelho Anti-Humano Ciclina D1, Clone EP12 (Dako, California, USA), diluição 1:50;
- ✓ anticorpo Anti-Ki-67 (Clone MIB-1 M7240, Dako), diluição de 1:100.

A contra-coloração foi realizada com o sistema In Vision™ Flex hematoxilina (K8008, Dako) e em seguida foi realizada a montagem das lâminas.

Para o controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por uma solução salina de tampão fosfato; e para o controle positivo, foi utilizado um tecido de carcinoma espinocelular de lábio, o qual anteriormente já havia apresentado expressão intensamente positiva para os três marcadores. Os resultados foram considerados positivos quando a cor marrom apareceu na membrana, no citoplasma ou no núcleo das células normais e neoplásicas.

4.3.4 Avaliação imunohistoquímica

No grupo controle, assim como nas queilites actínicas com displasia epitelial leve e moderada, a expressão dos marcadores foi avaliada dividindo a espessura do epitélio em quatro compartimentos: camada basal, camada suprabasal (aproximadamente três camadas de células), terço médio e terço superior (Figura 3). Foram realizadas imagens de três campos aleatórios do epitélio dos espécimes do grupo controle. Nas queilites actínicas elegeu-se a área displásica e as imagens foram realizadas em três campos consecutivos.

As queilites actínicas com displasia epitelial intensa por serem consideradas carcinomas *in situ* (Cis) foram avaliadas da mesma forma que os carcinomas espinocelulares bem e moderadamente diferenciados. Sendo a expressão dos marcadores avaliada nas áreas de maior displasia nos carcinomas *in*

situ e no *front* de invasão do tumor nos carcinomas bem e moderadamente diferenciados. O epitélio foi dividido em camada basal, camada suprabasal e região interna (Figura 4). Logo, foram obtidas imagens de três campos consecutivos.

Todas as imagens foram feitas a partir de uma câmera digital de alta resolução (Axiocam, MRc, ZEISS) acoplada a um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS) com uma objetiva de 20X. A câmera apresentava-se conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL) contendo um programa de aquisição e análise de imagens (Axiovision, 4.6, ZEISS).

A contagem das células imunomarcadas pelos diferentes marcadores foi realizada sempre no mesmo ambiente, apropriadamente escurecido e utilizando o mesmo computador (Core i5, DELL). As imagens foram visualizadas no programa Power Point do Windows, e quando necessário, foi feito o uso da ferramenta de zoom. O número total de células positivas e negativas visualizadas nos três campos foi contado em cada região da camada epitelial, e em seguida obteve-se a porcentagem de células positivas.

4.3.4.1 Avaliação imunohistoquímica de β -Catenina

A avaliação da expressão imunohistoquímica de β -Catenina foi realizada com base na localização (membranosa, citoplasmática e nuclear) da coloração nas diferentes camadas do epitélio. Foi feita a contagem do número total de células para os diferentes tipos de expressão, sendo assim obtida a porcentagem de células positivas para cada tipo expressão nas diferentes camadas epiteliais.

Para fins comparativos obteve-se a média de expressão nas camadas epiteliais e a amostra foi dividida de duas maneiras. Em uma delas o grupo das queilites actínicas foi dividido em queilites actínicas com displasia epitelial leve, moderada e severa/Cis, e estes subgrupos foram comparados entre si e com o grupo controle. Em uma segunda forma de divisão, a amostra foi dividida em três grandes grupos: controle, queilites actínicas e carcinomas espinocelulares, os quais foram comparados entre si. Neste caso o grupo das queilites actínicas incluía as queilites com displasia epitelial leve e moderada. E as queilites actínicas com displasia epitelial intensa/Cis foram incluídas no grupo dos carcinomas espinocelulares.

Figura 3 - No grupo controle e nas queilites actínicas, o epitélio foi dividido em quatro compartimentos, camada basal, camada suprabasal, terço médio e terço superior.

Figura 4 - No grupo dos carcinomas espinocelulares, o epitélio foi dividido em três compartimentos, camada basal, camada suprabasal e região interna.

4.3.4.2 Avaliação imunohistoquímica de ciclina D1 e do anticorpo anti-Ki-67

Para a avaliação imunohistoquímica da expressão de ciclina D1 e do anticorpo anti-Ki-67 foi considerada a expressão nuclear das células epiteliais nas diferentes camadas do epitélio. A partir da contagem do número total de células obteve-se a porcentagem de células positivas para cada região.

Assim como foi feito para avaliação comparativa da expressão de β -catenina, foi obtida a média de expressão nas diferentes camadas epiteliais e a amostra foi dividida das duas maneiras esclarecidas acima.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador SPSS for Windows versão 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Para as análises (cálculos de valores de p) foi utilizado SUDAAN versão 7.0 (Research Triangle Institute, RTP, NC).

Para a comparação da média de expressão de cada marcador, nas diferentes localizações do epitélio, entre os diferentes grupos, foi utilizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis. E para a correlação da expressão dos três marcadores entre os grupos foi utilizada a correlação de Spearman. Sempre considerando nível de significância de 5%.

4.5 AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas por meio do mesmo sistema de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.6, ZEISS) utilizadas para avaliação imunohistoquímica.

4.6 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Granada (Espanha). Processo nº: 191/CEIH/2016. Anexo A.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

A amostra foi constituída por 45 pacientes portadores de queilite actínica com displasia epitelial submetidos ao tratamento no Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de 2006 a 2011 e de 30 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior submetidos ao tratamento no Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, entre 2008 e 2013. E ainda, 15 amostras de epitélio oral normal oriundas de mucocelos e hiperplasias fibrosas inflamatórias também obtidas de pacientes submetidos ao tratamento no Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, no mesmo período, as quais foram utilizadas como grupo controle,

Neste capítulo, são apresentadas as distribuições percentuais das características demográficas e microscópicas da casuística descrita acima. Microscopicamente foram avaliadas algumas características teciduais e celulares em coloração de rotina, ou seja, em Hematoxilina e Eosina, bem como a expressão epitelial de três marcadores, β -catenina, ciclina D1 e Ki-67, por meio da técnica imunohistoquímica.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Na Tabela 1 pode-se observar a distribuição dos três grupos: controle, queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio, de acordo com o gênero e a idade. Sendo a queilite actínica com displasia intensa considerada um carcinoma *in situ* (Cis), estas foram incluídas e avaliadas no grupo dos carcinomas espinocelulares. Desse modo, o grupo dos carcinomas incluiu 15 carcinomas *in situ* (Cis) e 30 carcinomas espinocelulares invasivos de lábio (CECs).

A maior frequência tanto de queilite actínica quanto de carcinomas espinocelulares de lábio foi detectada em mais de 90% em pacientes do gênero masculino. Coincidentemente no grupo controle a maior prevalência foi de homens (66,7% dos pacientes), conforme descrito na Tabela 1.

As idades mínima e máxima observadas entre os pacientes dos grupos controle, queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio foram de 12--92 anos, sendo a média 64 anos. Na Tabela 1 pode-se observar a distribuição dos pacientes de acordo a média estabelecida.

Tabela 1 - Distribuição das características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, 2008 e 2013.

Variável	Controle n (%)	Queilites Actínicas n (%)	Carcinomas n (%)
Gênero			
Masculino	10 (66,7%)	28 (93,3%)	41 (91,1%)
Feminino	5 (33,3%)	2 (6,7%)	4 (8,9%)
Idade média			
≥ 64 anos	12 (80,0%)	17 (56,6%)	11 (24,4%)
< 64 anos	3 (20,0%)	13 (43,3%)	34 (75,6%)
Total	15 (100%)	30 (100%)	45 (100%)

Para os pacientes do grupo dos carcinomas espinocelulares de lábio foi possível obter outras informações como a ocorrência ou não de recidivas e a condição atual do paciente. De acordo com as informações obtidas, dos 45 pacientes portadores de carcinomas (15 Cis + 30 CECs), 15 (33,3%) pacientes apresentaram recidiva, destes, 2 eram carcinomas *in situ*, 9 eram carcinomas espinocelulares bem diferenciados e 4 eram carcinomas espinocelulares moderadamente diferenciados. Quanto à condição atual desses pacientes, foi registrado que 88,8% encontravam-se vivos e 11,2% já haviam morrido, entretanto,

não foi relatado se a morte ocorreu devido à doença. O tempo médio de seguimento foi de 5 anos.

5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

5.3.1 Classificação histopatológica das queilites actínicas

A classificação das alterações epiteliais e a graduação da intensidade da displasia epitelial nas queilites actínicas, coradas em hematoxilina e eosina, seguiu os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (GALE et al., 2005), com base nas alterações da arquitetura epitelial e da morfologia celular, conforme descrito no capítulo de casuística e métodos.

No grupo controle, os epitélios da mucosa labial foram classificados em normais ou hiperplásicos (Figura 5A). Sendo 7 (46,7%) espécimes classificados como normais e 8 (53,3%) como hiperplásicos .

No grupo das queilites actínicas, 15 espécimes foram classificadas como queilites actínicas com displasia leve (Figura 5B), 15 como queilites actínicas com displasia moderada (Figura 5C) e 15 como queilites actínicas com displasia intensa ou carcinoma *in situ* (Cis) (Figura 5D).

5.3.2 Classificação histopatológica dos carcinomas espinocelulares de lábio

A classificação histopatológica dos carcinomas espinocelulares de lábio seguiu os critérios utilizados pela Organização Mundial de Saúde, (BARNES et al. 2005), com base no grau de diferenciação celular .

Desse modo, no grupo dos carcinomas espinocelulares de lábio 22 tumores foram classificados como bem diferenciados (Figura 5E) e 8 como moderadamente diferenciados (Figura 5F).

De acordo com as informações obtidas por meio dos laudos histopatológicos, o estadiamento clínico desses tumores variou entre T1N0M0 e

T1N1M0. Dentre os 22 tumores classificados como bem diferenciados, 19 (86,3%) eram T1N0M0 e 3 (13,7%) eram T1N1M0. Já dentre os 8 tumores classificados como moderadamente diferenciados, 4 (50%) eram T1N0M0 e 4 (50%) eram T1N1M0.

Figura 5 - Classificação histopatológica. A – Epitélio oral hiperplásico; B – Epitélio oral com displasia leve; C – Epitélio oral com displasia moderada; D – Epitélio oral com displasia intensa; E – Carcinoma bem diferenciado; F – Carcinoma moderadamente diferenciado (Hematoxilina e Eosina/200x).

5.3.3 Expressão imunohistoquímica de β -catenina

No grupo controle e nas queilites actínicas a expressão de β -catenina foi avaliada considerando o epitélio como um todo, ressaltando as áreas displásicas nas queilites actínicas. Nos carcinomas espinocelulares de lábio (Cis + CECs) a expressão de β -catenina foi avaliada nos Cis na região de maior intensidade da displasia epitelial e nos CECs no *front* de invasão do tumor.

Além disso, no grupo controle e nas queilites actínicas o epitélio foi dividido em quatro compartimentos, camada basal, camada suprabasal, terço médio e terço superior. Já nos carcinomas (Cis + CECs) o epitélio foi dividido em camada basal, camada suprabasal e região interna, devido à desorganização e à falta de estratificação das camadas epiteliais mais internas.

Nos diferentes grupos a avaliação da expressão de β -Catenina também foi realizada com base na localização (membranosa, citoplasmática e nuclear) da coloração.

A partir de imagens obtidas de três campos microscópicos consecutivos de cada espécime o número total de células positivas e negativas visualizadas em cada campo foi contado obtendo-se a porcentagem de células positivas com base na localização (membranosa, citoplasmática e nuclear) da coloração nas diferentes camadas epiteliais. Para fins comparativos foi obtida a média da porcentagem de células positivas nas diferentes localizações e camadas epiteliais.

5.3.4 Expressão imunohistoquímica de ciclina D1 e Ki-67

A avaliação de ciclina D1 e de Ki-67 foram realizadas nos mesmo locais avaliados para a expressão de β -catenina. Entretanto, diferentemente da β -Catenina que pode se expressar na membrana, citoplasma e núcleo, a expressão tanto da ciclina D1 quanto do Ki-67 foi exclusivamente nuclear. Logo, foram obtidas imagens de três campos microscópicos consecutivos de cada espécime e o número total de células positivas e negativas visualizadas em cada campo foi contado obtendo-se a porcentagem de células positivas nas diferentes camadas epiteliais. Para fins

comparativos foi obtida a média da percentagem de células positivas nas diferentes localizações.

5.3.5 Comparação da expressão de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 em queilites actínicas com displasia epitelial leve, moderada e intensa

Com intuito de avaliar a expressão dos diferentes biomarcadores no epitélio labial com diferentes intensidades de displasia epitelial dividimos o grupo das queilites actínicas em espécimes com displasia epitelial leve, moderada e intensa/Cis. Em seguida estes grupos foram comparados com o grupo controle como descrito nas Tabelas 2 e 3.

❖ Expressão membranosa de β -catenina

Observamos que a expressão membranosa de β -catenina nas camadas basal, suprabasal e terço médio foi alta sendo 100% de células positivas em todos os grupos. Porém, observou-se uma perda, estatisticamente significativa ($p=0,006$), dessa expressão na camada basal das queilites actínicas com displasia intensa/Cis, conforme pode ser observado na Tabela 2.

❖ Expressão citoplasmática de β -catenina

A expressão citoplasmática de β -catenina foi ausente em todas as camadas epiteliais do grupo controle e apresentou um aumento gradativo e estatisticamente significativo ($p=0,000$) nas camadas basal e suprabasal à medida que aumentava a intensidade da displasia epitelial nas queilites actínicas. No terço médio também foi possível observar uma discreta expressão citoplasmática nas queilites actínicas com displasia epitelial leve e moderada, como descrito na Tabela 2.

❖ Expressão nuclear de β -catenina

A expressão nuclear de β -catenina além de ter sido ausente em todas as camadas epiteliais do grupo controle, manteve-se bastante escassa nos demais grupos. No entanto, assim como foi observado para a expressão citoplasmática, a expressão nuclear de β -catenina nas camadas basal e suprabasal aumentava diretamente proporcional à intensidade de displasia epitelial ($p=0,000$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição da média de expressão de β -catenina no grupo controle e queilite actínica de acordo com a intensidade da displasia epitelial. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecilio de Granada, Espanha, 2008 e 2013.

β -catenina	Controle (n=15)	Queilite actínica leve (n=15)	Queilite actínica moderada (n=15)	Queilite actínica intensa/Cis (n=15)	<i>p</i>
Membrana					
Basal	100,0	100,0	100,0	96,8	0,006*
Suprabasal	100,0	100,0	100,0	100,0	1,000
Terço médio	100,0	100,0	100,0	-	1,000
Terço superior	0,0	6,1	4,7	-	0,005*
Citoplasma					
Basal	0,0	19,8	23,5	30,9	0,000*
Suprabasal	0,0	11,1	19,6	24,3	0,000*
Terço médio	0,0	1,6	4,1	-	0,000*
Terço superior	0,0	0,0	0,0	-	1,000
Núcleo					
Basal	0,0	1,7	4,6	7,2	0,000*
Suprabasal	0,0	0,4	2,2	3,5	0,000*
Terço médio	0,0	0,0	0,6	-	0,004*
Terço superior	0,0	0,0	0,0	-	1,000

p: nível descritivo do teste de Kruskal-Wallis. $p<0,001$ *: estatisticamente significativa.

❖ Expressão de ciclina D1

A expressão de ciclina D1 na camada basal aumentava significativamente ($p=0,014$) à medida que aumentava a intensidade da displasia epitelial nas queilites actínicas. Comparando as camadas basal e suprabasal, observou-se que a expressão desse biomarcador na camada suprabasal intensificou-se em todos os grupos com exceção das queilites actínicas intensas/Cis. O grupo das queilites actínicas com displasia moderada foi o que apresentou maior média de expressão de ciclina D1 (51,9% dos espécimes) na camada suprabasal. No terço médio, a expressão de ciclina D1 foi ausente no grupo controle e discreta nas queilites actínicas com displasia leve e moderada, conforme apresentado na Tabela 3.

❖ Expressão de Ki-67

A expressão de Ki-67 foi bastante semelhante à expressão de ciclina D1 nas queilites actínicas. Na camada basal observou-se que a expressão de Ki-67 aumentava à medida que aumentava a intensidade da displasia epitelial ($p=,000$). Na camada suprabasal a expressão de Ki-67 foi maior se comparada com a camada basal, com exceção das queilites actínicas com displasia intensa/Cis. Assim como verificado para a ciclina D1, a expressão de Ki-67 na camada suprabasal das queilites actínicas não apresentou aumento diretamente proporcional à intensidade da displasia epitelial. Intrigantemente, foi o grupo controle que apresentou a maior média de expressão de Ki-67 (30,3% dos espécimes) na camada suprabasal. No terço médio, assim como foi observado para ciclina D1, a expressão de Ki-67 foi ausente no grupo controle e discreta nas queilites actínicas com displasia leve e moderada (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição da média de expressão de ciclina D1 e Ki-67 no grupo controle e queilite actínica de acordo com a intensidade da displasia epitelial. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecilio de Granada, Espanha, 2008 e 2013.

Ciclina D1	Controle (n=15)	Queilite actínica leve (n=15)	Queilite actínica moderada (n=15)	Queilite actínica intensa/Cis (n=15)	<i>p</i>
Basal	15,0	24,4	30,5	38,9	0,014*
Suprabasal	36,2	37,1	51,9	36,0	0,051
Terço médio	0,0	2,9	3,5	-	0,009*
Terço superior	0,0	0,0	0,0	-	1,000
Ki-67					
Basal	14,4	21,7	25,4	46,5	0,000*
Suprabasal	30,3	25,9	27,5	29,4	0,598
Terço médio	0,0	1,4	2,8	-	0,004*
Terço superior	0,0	0,0	0,0	-	1,000

p: nível descritivo do teste de Kruskal-Wallis. $p < 0,001^*$: estatisticamente significativa.

Figura 6 - Expressão de β -catenina na mucosa labial. A – Controle – expressão membranosa presente em todas as camadas epiteliais, com exceção do terço superior que foi negativo; e expressão citoplasmática e nuclear ausentes. B – Queilite actínica com displasia epitelial leve – expressão membranosa presente em todas as camadas epiteliais. C – Queilite actínica com displasia epitelial moderada – expressão membranosa presente em todas as camadas epiteliais, exceto terço superior e expressão citoplasmática e nuclear nas camadas basal e suprabasal. D – Carcinoma in situ/displasia epitelial intensa – perda discreta de expressão membranosa na camada basal e expressão citoplasmática e nuclear significativamente mais intensas nas camadas basal, suprabasal e região interna. (Imunohistoquímica – anti- β -catenina 200x).

Figura 7 - Expressão de ciclina D1 na mucosa labial. A – Grupo controle – expressão discreta na camada basal e levemente mais intensa na camada suprabasal; B – Queilite actínica com displasia leve – expressão intensa na camada suprabasal e no terço médio; C – Queilite actínica com displasia moderada – aumento da intensidade da expressão nas camadas epiteliais (basal, suprabasal e terço médio); D – Queilite actínica com displasia intensa/Cis – expressão intensa na camada basal e suprabasal do epitélio tumoral desorganizado. (Imunohistoquímica – anti-ciclina D1 200x).

Figura 8 - Expressão de Ki-67 na mucosa labial. A – Grupo controle – expressão discreta na camada basal e levemente mais intensa na camada suprabasal; B – Queilite actínica com displasia leve – expressão mais intensa do que no grupo controle, principalmente na camada suprabasal; C – Queilite actínica com displasia moderada – a expressão aumenta ainda mais sua intensidade na camada suprabasal e terço médio; D – Queilite actínica com displasia intensa/Cis – observa-se na camada basal um aumento da expressão à medida que aumenta a displasia epitelial. (Imunohistoquímica – anti-Ki-67 200x).

5.3.6 Comparação da expressão de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 em queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio

Com intuito de comparar a expressão dos diferentes biomarcadores no epitélio labial normal, displásico e neoplásico, foi realizada uma análise incluindo o grupo controle, as queilites actínicas com displasia leve e moderada e o grupo de carcinomas espinocelulares composto pelos carcinomas *in situ* e carcinomas espinocelulares invasivos de lábio, como descrito nas Tabelas 4 e 5.

No epitélio do grupo controle e das queilites actínicas (leve e moderada) a análise foi realizada nas camadas basal, suprabasal, terço médio e terço superior. No epitélio neoplásico do grupo dos carcinomas espinocelulares de lábio, incluindo as queilites com displasia intensa/carcinomas *in situ*, analisou-se as camadas basal, suprabasal e região interna, devido a dificuldade de estratificar as camadas epiteliais tumorais.

Assim para fins comparativos, a região interna do grupo dos carcinomas espinocelulares de lábio foi comparada à média obtida da soma do terço médio e do terço superior dos grupos controle e queilites actínicas.

❖ Comparação da expressão membranosa de β -catenina

Observamos que a expressão membranosa de β -catenina nas camadas basal, suprabasal e terço médio foi alta mantendo-se 100% de células positivas em todos os grupos analisados. Porém, observou-se uma perda, estatisticamente significativa ($p=0,000$), dessa expressão na camada basal dos carcinomas espinocelulares de lábio se comparado com as queilites actínicas e com o grupo controle, conforme pode ser observado na Tabela 4. Quando a porção interna dos carcinomas espinocelulares de lábio foi comparada com a média obtida da soma do terço médio e terço superior dos grupos controle e queilites actínicas, notou-se uma maior e significativa expressão membranosa desse biomarcador no grupo tumoral ($p=0,001$) (Tabela 4).

❖ Comparação da expressão citoplasmática de β -catenina

A expressão citoplasmática de β -catenina foi ausente em todas as camadas epiteliais do grupo controle. Nos grupos queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio observou-se um aumento gradativo e estatisticamente significativo ($p=0,000$) da expressão citoplasmática de β -catenina nas camadas basal e suprabasal refletindo o processo de desorganização epitelial tumoral. A expressão citoplasmática na região interna dos carcinomas espinocelulares de lábio foi significativamente maior ($p=0,000$) do que nas queilites actínicas, as quais apresentaram uma média de expressão bastante discreta (1,4%), conforme descrito na Tabela 4.

❖ Comparação da expressão nuclear de β -catenina

A expressão nuclear de β -catenina foi ausente em todas as camadas epiteliais do grupo controle e escassa nos demais grupos analisados. No entanto, assim como foi observado para a expressão citoplasmática, a expressão nuclear de β -catenina nas camadas basal e suprabasal aumentou gradativamente à medida que aumentou a desorganização epitelial ($p=0,000$). Na região interna dos carcinomas espinocelulares de lábio a expressão nuclear de β -catenina foi ainda mais discreta do que a expressão citoplasmática. Além disso, a expressão da região interna dos carcinomas espinocelulares foi maior e estatisticamente significativa ($p=0,000$) se comparada com os demais grupos controle e de queilite actínica, como pode ser confirmado na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição da média de expressão de β -catenina no grupo controle, queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, 2008 e 2013.

β -catenina	Controle (n=15)	Queilite actínica (n=30)	Carcinomas (n=45)	p
Membrana				
Basal	100,0	100,0	95,1	0,000*
Suprabasal	100,0	100,0	100	1,000
Terço médio	100,0	100,0	-	1,000
Terço superior	0,0	5,4	-	0,001*
Região interna	50,0	52,7	58,2	0,001*
Citoplasma				
Basal	0,0	21,7	28,5	0,000*
Suprabasal	0,0	15,4	23,6	0,000*
Terço médio	0,0	2,8	-	0,000*
Terço superior	0,0	0,0	-	1,000
Região interna	0,0	1,4	12,9	0,000*
Núcleo				
Basal	0,0	3,1	7,5	0,000*
Suprabasal	0,0	1,3	4,4	0,000*
Terço médio	0,0	0,3	-	0,098
Terço superior	0,0	0,0	-	1,000
Região interna	0,0	0,1	3,1	0,000*

p: nível descritivo do teste de Kruskal-Wallis. $p < 0,001^*$: estatisticamente significativa.

❖ Comparação da expressão de ciclina D1

A expressão de ciclina D1 na camada basal aumentou significativamente à medida que aumentou a desorganização epitelial ($p=0,000$). Apesar da expressão desse biomarcador na camada suprabasal ter se intensificado em relação à camada basal em todos os grupos com exceção do grupo dos carcinomas espinocelulares de lábio, o aumento da expressão não se manteve diretamente proporcional à desorganização epitelial, sendo as queilites actínicas o grupo que apresentou maior média de expressão (44,5% dos espécimes) na camada suprabasal. Quando a porção interna do grupo dos carcinomas espinocelulares de lábio foi comparada com a média obtida da soma do terço médio e terço superior dos grupos controle e queilites actínicas, notou-se uma maior e significativa expressão de ciclina D1 no grupo tumoral ($p=0,000$) (Tabela 5).

❖ Comparação da expressão de Ki-67

A expressão nuclear de Ki-67 foi bastante semelhante à expressão de ciclina D1. Na camada basal observou-se que a expressão de Ki-67 aumentou à medida que aumentou a desorganização epitelial ($p=,000$). Na camada suprabasal a expressão de Ki-67 também se intensificou em relação à camada basal, com exceção do grupo dos carcinomas espinocelulares de lábio. A expressão de Ki-67 na região interna dos carcinomas foi significativamente maior ($p=0,000$) comparada aos demais grupos avaliados (grupo controle e grupo de queilites actínicas), como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição da média de expressão de ciclina D1 e Ki-67 no grupo controle, queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, 2008 e 2013.

Ciclina D1	Controle (n=15)	Queilites actínicas (n=30)	Carcinomas (n=45)	p
Basal	15,0	27,4	56,1	0,000*
Suprabasal	36,2	44,5	40,9	0,497
Terço médio	0,0	3,2	-	0,005*
Terço superior	0,0	0,0	-	1,000
Região interna	0,0	1,6	4,9	0,000*
Ki-67				
Basal	14,4	23,6	58,4	0,000*
Suprabasal	30,3	26,7	32,5	0,458
Terço médio	0,0	2,1	-	0,002*
Terço superior	0,0	0,0	-	1,000
Região interna	0,0	1,1	8,5	0,000*

p: nível descritivo do teste de Kruskal-Wallis. $p < 0,001^*$: estatisticamente significativa.

Figura 9 - Expressão de β -catenina na mucosa labial. A – Controle – expressão membranosa presente em todas as camadas epiteliais, com exceção do terço superior e expressão citoplasmática e nuclear ausentes. B – Queilite actínica – expressão membranosa presente em todas as camadas epiteliais, com predomínio da expressão citoplasmática nas camadas basal, suprabasal e terço médio; expressão nuclear bastante discreta, presente nas camadas basal, suprabasal e terço médio. C – Carcinoma espinocelular de lábio - perda da expressão membranosa na camada basal e aumento das expressões citoplasmática e nuclear nas camadas basal, suprabasal e região interna. (Imunohistoquímica – anti- β -catenina 200x).

Figura 10 - Expressão de ciclina D1 na mucosa labial. A – Grupo controle – expressão discreta na camada basal e levemente mais intensa na camada suprabasal; B – Queilite actínica – expressão mais intensa do que no grupo controle, principalmente na camada suprabasal, no entanto também pode ser observada no terço médio; C – Carcinoma espinocelular de lábio – comparando com os demais grupos, a expressão na camada basal mostrou ser ainda mais intensa, sendo possível observar que houve um aumento diretamente proporcional a desorganização epitelial. (Imunohistoquímica – anti-ciclina D1 200x).

Figura 11 - Expressão de Ki-67 na mucosa labial. A – Grupo controle – expressão discreta na camada basal e levemente mais intensa na camada suprabasal; B – Queilite actínica – expressão mais intensa do que no grupo controle, principalmente na camada suprabasal, no entanto também pode ser observada no terço médio; C – Carcinoma espinocelular de lábio – comparando com os demais grupos, a expressão na camada basal mostrou ser ainda mais intensa e aumentava diretamente proporcional a desorganização epitelial. (Imunohistoquímica – anti-Ki-67 200x).

5.3.7 Correlação entre a expressão média de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 em queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio

❖ Expressão de β -catenina X ciclina D1

Não houve correlação entre a expressão citoplasmática de β -catenina com a expressão nuclear de ciclina D1 nas diferentes camadas epiteliais nos grupos controle, queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio. Assim como, também não obteve-se nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a expressão nuclear de β -catenina e a expressão de ciclina D1, como pode ser observado na Tabela 6.

❖ Expressão β -catenina X Ki-67

Correlacionando-se a expressão citoplasmática de β -catenina com a expressão nuclear de Ki-67 nas diferentes camadas epiteliais entre os grupos controle, queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio, obteve-se uma correlação estatisticamente significativa apenas na região interna ($p=0,025$) dos carcinomas. No entanto, não houve correlação entre a expressão nuclear de β -catenina com a expressão nuclear de Ki-67 nos diferentes grupos analisados, conforme descrito na Tabela 6.

❖ Expressão de ciclina D1 X Ki-67

As correlações da expressão de ciclina D1 e Ki-67 entre os grupos controle, queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio, foram estatisticamente significativas na camada suprabasal do grupo controle ($p=0,030$) e das queilites actínicas ($p=0,001$) e também na região interna dos carcinomas espinocelulares de lábio ($p=0,000$), conforme pode ser comprovado na Tabela 6.

Tabela 6 - Correlação entre a média de expressão de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 entre os grupos controle, queilite actínica e carcinomas. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Brasil, 2006 a 2011 e Hospital Clínico San Cecílio de Granada, Espanha, 2008 e 2013.

Variáveis	Controle (n=15)	Queilites (n=30)	Carcinomas (n=45)
B-catenina x Ciclina		r (p)	r (p)
<i>Citoplasma</i>			
- Basal	-	-0,130 (0,493)	-0,045 (0,768)
- Suprabasal	-	-0,412 (0,024)	-0,014 (0,928)
- Terço médio	-	0,203 (0,281)	
- Terço superior	-	-	
- Região Interna			0,092 (0,547)
<i>Núcleo</i>			
- Basal	-	-0,294 (0,115)	-0,111 (0,469)
- Suprabasal	-	-0,164 (0,386)	-0,202 (0,183)
- Terço médio	-	0,281 (0,133)	
- Terço superior	-	-	
- Região Interna			-0,16 (0,918)
B-catenina x Ki-67			
<i>Citoplasma</i>			
- Basal	-	0,348 (0,060)	-0,094 (0,535)
- Suprabasal	-	-0,231 (0,218)	-0,001 (0,993)
- Terço médio	-	0,276 (0,140)	
- Terço superior	-	-	
- Região Interna			0,334 (0,025)*
<i>Núcleo</i>			
- Basal	-	0,173 (0,361)	-0,172 (0,258)
- Suprabasal	-	0,141 (0,458)	0,147 (0,336)
- Terço médio	-	0,158 (0,406)	
- Terço superior	-	-	
- Região Interna			0,151 (0,321)
Ciclina x Ki-67			
<i>Núcleo</i>			
- Basal	0,234 (0,401)	0,186 (0,325)	0,151 (0,321)
- Suprabasal	0,559 (0,030)*	0,588 (0,001)*	0,157 (0,302)
- Terço médio	-	0,338 (0,068)	
- Terço superior	-	-	
- Região Interna			0,525 (0,000)*

Correlação de Spearman. $p < 0,05^*$: estatisticamente significativo.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

As lesões potencialmente malignas que afetam a boca continuam despertando o interesse clínico, pois, podem apresentar displasias epiteliais aumentando o risco de evolução para o carcinoma espinocelular de boca. Estão incluídas neste grupo, as queilites actínicas cuja etiopatogenia está bem estabelecida e, na maioria das vezes, ocorrem devido a exposição exacerbada a radiação ultravioleta do tipo B. Algumas alterações genotípicas e moleculares presentes nos queratinócitos labiais também são conhecidas sendo associadas com o início ou a evolução deste processo de cancerização na região dos lábios (LEFFELL, 2000; HORTA et al., 2007; WOOD et al., 2011).

Neste trabalho, a ideia inicial foi de contribuir com a carcinogênese labial tentando identificar a expressão de biomarcadores em lesões potencialmente malignas e também em fases mais adiantadas dos carcinomas espinocelulares de lábio.

A análise clínica e demográfica de nossa população de estudo mostrou dados muito semelhantes aqueles encontrados por outros autores na literatura científica (BILKAY et al., 2003; KORNEVS et al., 2005; HASSON, 2008). A maior frequência tanto de queilite actínica quanto de carcinomas espinocelulares de lábio foi detectada em mais de 90% em pacientes do gênero masculino (Tabela 1), o que pode ser justificado pela relação direta entre a questão ocupacional e a prevalência destas lesões bucais. A média de idade dos pacientes acometidos pelas queilites actínicas e carcinoma espinocelular de lábio foi bastante elevada, 64 anos, como pode ser observado na Tabela 1, reforçando que as alterações genéticas também na carcinogênese labial são resultados de um processo progressivo e acumulativo ao longo do tempo (GONZALEZ-MOLES et al., 2014).

Dos pacientes portadores de carcinomas espinocelulares de lábio, 33,3% destes apresentaram recorrência local da lesão, 88,8% encontravam-se vivos e apenas 11,2% já haviam morrido, entretanto, não foi relatado se a morte ocorreu devida ou não à doença maligna. Além disso, o estadiamento clínico desses tumores

variou entre T1N0M0 e T1N1M0, sendo a maioria dos tumores classificados como T1N0M0 (68,0%). Esses dados mostraram que, assim como Kornevs et al. (2005) afirmaram, embora o carcinoma espinocelular de lábio possa ser considerado uma lesão de bom prognóstico em comparação com outros tumores malignos na região da cabeça e pescoço, a recorrência local, as metástases regionais e até mesmo a morte pela doença podem ocorrer ocasionalmente.

Alguns estudos prévios mostraram que a radiação ultravioleta pode causar, entre outros danos, a desregulação na proliferação e na diferenciação dos queratinócitos, desencadeando o início ou a evolução do processo de malignização na região dos lábios (SHAH; DOHERTY; ROSEN, 2010; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012). Em nossa investigação buscamos verificar as alterações envolvidas na carcinogênese labial por meio da expressão da proteína β -catenina e de sua associação com o processo de proliferação celular identificado por meio do biomarcador Ki-67 e ciclina D1.

A β -catenina é uma proteína que contém múltiplas funções, as quais variam de acordo com sua localização celular (JAMIESON; SHARMA; HENDERSON, 2012; GONZALEZ-MOLES et al., 2014). Quando presente na membrana celular forma um complexo com a E-caderina responsável pela adesão celular, contribuindo com a formação da estrutura do epitélio escamoso estratificado da mucosa oral normal (MACDONALD; TAMAI; HE, 2009; SCHUSSEL; PINTO JÚNIOR; MARTINS, 2011; TIAN et al., 2011). No entanto, em epitélio de mucosa oral normal, a expressão de β -catenina é observada na região da membrana das células da camada basal e suprabasal, não sendo identificada nas camadas mais externas e diferenciadas (ROSADO et al., 2013).

No presente estudo foi observado que houve uma alta expressão membranosa de β -catenina nas camadas basal, suprabasal e terço médio de 100% dos queratinócitos dos grupos controle e de queilites actínicas com displasia leve e moderada (Tabela 2). Porém, observou-se uma perda, estatisticamente significativa, dessa expressão na camada basal das queilites actínicas com displasia intensa/Cis ($p=0,006$) e nos carcinomas espinocelulares de lábio ($p=0,000$), conforme descrito nas Tabelas 2 e 4. Esses resultados reforçam aqueles descritos em outras lesões potencialmente malignas na boca, por exemplo, em leucoplasias com displasias epiteliais, onde foi observado que havia uma perda da expressão membranosa de β -

catenina a medida que aumentava a intensidade da displasia epitelial (ISHIDA et al., 2007; CAI et al., 2008; LO MUZIO et al., 2009; LOPES et al., 2009; LAXMIDEVI et al., 2010; LIU; MILLAR, 2010; KAUR et al., 2013; REYS et al., 2015; SILVA et al., 2015). Nossos resultados também corroboram com os de Lopes et al. (2009) e Zaid (2014), ao sugerirem que a expressão membranosa reduzida de β -catenina está relacionada com o alto grau de indiferenciação celular dos queratinócitos neoplásicos.

Particularmente, esta perda da expressão membranosa de β -catenina em queilites actínicas displásicas e em carcinomas espinocelulares de lábio observada no presente estudo confirmam os resultados e as sugestões de Xavier et al. (2009). Segundo este autor (XAVIER et al., 2009) a perda de expressão membranosa de β -catenina, assim como as demais alterações do seu padrão de expressão sugerem que a via de sinalização de Wnt/ β -catenina está envolvida nos eventos iniciais da transformação maligna nas queilites actínicas. Posteriormente, as investigações de Schussel, Pinto Júnior, Martins (2011) também em queilites actínicas com diferentes graus de displasia epitelial e em carcinomas espinocelulares de lábio, contrastando com nossos resultados e aqueles de Xavier et al. (2009), mostraram que não houve perda mas apenas uma diminuição da intensidade da expressão membranosa de β -catenina a medida que aumentava o grau de displasia epitelial ou a indiferenciação tumoral.

Além da perda de expressão membranosa, a expressão citoplasmática alterada de β -catenina, como observada em nosso estudo, também está associada a transformação maligna, perda de diferenciação celular, maior proliferação, fenótipo mais agressivo, aumento da invasão do tumor e consequentemente pior prognóstico para os pacientes com câncer de boca (TANAKA et al., 2003; LAXMIDEVI et al., 2010; SCHUSSEL; PINTO JÚNIOR; MARTINS, 2011).

No presente estudo, não foi encontrada expressão citoplasmática de β -catenina nos queratinócitos normais do grupo controle (Tabela 2). No entanto, houve, nas queilites actínicas, um aumento gradativo da expressão citoplasmática nas camadas epiteliais basal e suprabasal a medida que aumentava a intensidade da displasia epitelial (Tabela 2). Este aumento da expressão citoplasmática de β -catenina também foi observado nos carcinomas espinocelulares de lábio (Tabela 4).

O acúmulo citoplásmico de β -catenina, pode ocorrer sob diversas condições, incluindo a mutação do gene β -catenina ou dos genes que codificam as proteínas responsáveis pela sua degradação (KALLURI; WEINBERG, 2009). No entanto, em geral, as mutações genéticas de β -catenina são raras na carcinogênese humana (GILLES et al., 2003; KALLURI; WEINBERG, 2009). Na maioria dos estudos em carcinomas bucais de cabeça e pescoço não foram encontradas mutações genéticas de β -catenina (ARCE; YOKOYAMA; WATERMAN, 2006; BOVOLENTA et al., 2008; MACDONALD; TAMAI; HE, 2009; KALLURI; WEINBERG, 2009); e, quando encontradas, estas mutações não significaram aumento de sua função (MACDONALD; TAMAI; HE, 2009).

Mutações no gene que codifica a proteína APC, necessária para a degradação de β -catenina, também são raras nos carcinomas espinocelulares de boca (HOPPLER; KAVANAGH, 2007). Observações semelhantes foram feitas para o gene da proteína Axin, também essencial para a degradação de β -catenina (HENDERSON; FAGOTTO, 2002). Outro mecanismo possível para o acúmulo de β -catenina no citoplasma é a perda de heterozigosidade do gene APC, a qual tem sido relatada em 25-75% dos carcinomas espinocelulares bucais (ATCHA et al., 2007; HOPPLER; KAVANAGH, 2007). No entanto, esta perda de heterozigosidade do gene APC não foi estudado na inativação de outros genes envolvidos na via de sinalização de Wnt.

Diante da raridade de mutações nos genes de β -catenina, APC e Axin foi sugerido que a ativação da via Wnt em carcinomas espinocelulares bucais e, provavelmente, também em carcinomas espinocelulares de lábio, pode ocorrer devido às alterações epigenéticas que têm sido observadas em alguns casos de carcinomas espinocelulares de boca (JAMIESON; SHARMA; HENDERSON, 2012).

Secundariamente ao aumento da expressão citoplasmática de β -catenina, pode ser observado sua expressão nuclear como consequência de sua translocação ao núcleo, devido ao seu acúmulo no citoplasma celular (GONZALEZ-MOLES et al., 2014). Corroborando com esses autores, o presente estudo comprovou que a expressão nuclear de β -catenina foi observada nas queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de boca com expressão citoplasmática desta proteína. Assim sendo, o grupo de queratinócitos normais (grupo controle) onde não foi detectada a expressão citoplasmática de β -catenina, também não foi observado sua expressão

nuclear (Tabelas 2 e 4). As queilites actínicas apresentaram uma expressão nuclear bastante discreta nas camadas basal e suprabasal e os carcinomas espinocelulares de lábio mostraram uma expressão nuclear significativamente mais alta do que nos demais grupos (controle e queilites actínicas). No entanto, essa expressão nuclear mesmo nos carcinomas, foi bastante discreta, apresentando positividade de no máximo 7,5% das células (Tabela 4).

Essa expressão nuclear de β -catenina encontrada nos queratinócitos alterados vem sendo considerada um marcador para células progenitoras malignas, responsáveis pelo crescimento do tumor (TIAN et al., 2011; GONZALEZ-MOLES et al., 2014). Portanto, na carcinogênese labial, como observada no presente estudo, embora discreta, a expressão nuclear de β -catenina poderia estar associada a presença e manutenção das células progenitoras malignas do epitélio bucal.

Quando presente no núcleo, a β -catenina pode ativar oncogenes envolvidos no aumento da proliferação celular, como a ciclina D1 (IWAI et al., 2005; ODAJIMA et al., 2005; ISHIDA et al., 2007; GONZALEZ-MOLES et al., 2014). Esse mecanismo contribui no processo da carcinogênese de alguns tipos de tumor (FERRAZZO et al., 2009; LILL et al., 2015). No entanto, ainda não está claro se o acúmulo de β -catenina pode afetar a regulação do gene ciclina D1 em carcinomas espinocelulares da boca (SHIRATSUCHI et al., 2007). Alguns estudos prévios, avaliando a superexpressão de ciclina D1 em carcinomas espinocelulares bucais mostraram que essa alteração da expressão de ciclina D1 não foi provocada pelas mutações de β -catenina (ODAJIMA et al., 2005; SALES et al., 2014). Portanto, a expressão de β -catenina e ciclina D1 nos carcinomas espinocelulares de boca provavelmente ocorrem por uma combinação de eventos independentes, e a superexpressão de ciclina D1 pode ser causada por alguma outra alteração genética (SALES et al., 2014).

No presente estudo, o aumento da expressão de ciclina D1 foi correlacionado diretamente com o aumento da displasia epitelial, corroborando com os resultados de Ramasubramanian et al. (2013) que também encontraram, ao avaliarem a ciclina D1 em lesões potencialmente malignas de boca, um aumento desta expressão a medida que aumentava a desorganização epitelial e a evolução das queilites actínicas para o grupo dos carcinomas espinocelulares de lábio. No entanto, a análise estatística dos nossos resultados por meio da correlação de

Spearman, não mostrou relação estatisticamente significativa entre a expressão nuclear de β -catenina e a superexpressão de ciclina D1, reforçando que, provavelmente, outros mecanismos oncogênicos afetando as expressões de ciclina D1 e de β -catenina estão envolvidos neste processo de carcinogênese, conforme foi sugerido previamente por Odajima et al. (2005) e Sales et al. (2014).

Nossos resultados relativos a expressão de ciclina D1 nos queratinócitos normais dos grupo controle mostrou uma expressão bastante escassa na camada basal (15,0%), uma expressão significativa na camada suprabasal (36,2%) e uma expressão negativa nas outras camadas epiteliais (Tabela 3). Isto indica que no epitélio labial normal a ciclina D1 é expressa em resposta aos processos fisiológicos de manutenção da homeostasia e da regeneração epitelial, comportamento este confirmado pelas células imunomarcadas pelo Ki-67, conforme observado em nosso estudo. Além disso, a expressão de ciclina D1 e Ki-67 escassa na camada basal, a expressão significativa na camada suprabasal e ausente nas demais camadas epiteliais traduzem a forma de proliferação fisiológica assimétrica do epitélio labial normal (GONZALEZ-MOLES et al., 2014).

Comparando a expressão de ciclina D1 nos diferentes grupos, observou-se que a expressão desse biomarcador na camada basal aumentava a medida que aumentava a desorganização epitelial, traduzindo a significativa implicação do oncogene ciclina D1 (CCDN1) no processo de transformação maligna do epitélio labial, principalmente nas células da camada basal (Tabela 5 e Figura 10).

Diante desse comportamento da expressão de ciclina D1 junto com a escassa expressão nuclear apresentada por β -catenina nos diferentes grupos investigados no presente trabalho, podemos sugerir que no processo de transformação maligna labial, a expressão nuclear de β -catenina e a superexpressão de ciclina D1 provavelmente estão ocorrendo por uma combinação de eventos oncogênicos independentes.

Além da via de Wnt, envolvendo a ciclina D1 e a β -catenina, outras diferentes vias de sinalização celular também podem estar atuando no mecanismo regulador da ativação oncogênica de ciclina D1 (SATHYAN; NALINAKUMARI; KANNAN, 2007; FU; FENG, 2015; MISHRA; NAGINI; RANA, 2015). Como por exemplo, a via de sinalização de Ras onde foi comprovado que a ativação somática do oncogene K-ras, utilizando tamoxifeno, em um experimento com animais,

promoveu a superexpressão de ciclina D1 e o desenvolvimento tumoral, principalmente na região cutânea do lábio (VAN DER WEYDEN et al., 2011). Também a via de PI3K/Akt, ao ser avaliada em carcinomas escamosos de cabeça e pescoço, apresentou indícios de conduzir a superexpressão de ciclina por meio da fosforilação de Akt (SALES et al., 2014).

Outras alterações como a ampliação do gene ciclina D1 (CCND1), polimorfismos genéticos e outros eventos mutacionais também podem estar envolvidos na superexpressão de ciclina D1. A avaliação prévia sobre a superexpressão de ciclina em carcinomas espinocelulares de diferentes regiões do corpo humano mostrou que a amplificação do gene ciclina D1 (CCND1) constitui uma das alterações mais comuns nestas neoplasias (SANTARIUS et al., 2010). Além disso, após realizarem uma ampla revisão, Santarius et al. (2010) afirmaram que há evidências da amplificação e também da superexpressão de ciclina D1 em carcinomas espinocelulares de boca.

Por outro lado, têm sido identificados diversos polimorfismos do gene CCND1, sendo o polimorfismo G/A870 o mais pesquisado, pois, o alelo A870, o qual pode ou não estar presente, codifica uma isoforma conhecida como ciclina D1b, que tem sido associada com o aumento do risco de câncer em algumas populações, particularmente na população asiática (WANG et al., 2014).

Um mecanismo emergente que vem sendo investigado é a mutação de microRNAs que podem ter como alvo o gene CCND1 ou outros genes que expressam proteínas reguladoras da atividade transcripcional de CCND1 em carcinomas espinocelulares de boca, mas ainda existem poucos estudos publicados sobre este assunto (JIA et al., 2013; CHI, 2015; JIA et al., 2015).

Diante do exposto acima, não se pode afirmar qual a alteração responsável pela superexpressão de ciclina D1 na carcinogênese labial, como observado no presente trabalho, sendo necessárias mais investigações envolvendo técnicas de biologia molecular para uma maior compreensão dos mecanismos genéticos que induzem estas alterações nos queratinócitos neoplásicos.

Além da ciclina D1, também foi analisada neste estudo, outra proteína que permite identificar as células epiteliais que estão no ciclo celular, o Ki-67. Alguns estudos recentes (GONZALES-MOLES et al., 2000; TAKEDA et al., 2006;

GONZALES-MOLES et al.; 2010; GARCIA et al., 2016) têm utilizado este biomarcador não apenas para determinar o índice de proliferação celular dos epitélios bucais, mas também para avaliar o padrão de proliferação nas diferentes camadas epiteliais, inclusive em queilites actínicas. Está bem estabelecido que o padrão de proliferação do epitélio de lesões potencialmente malignas e lesões malignas bucais difere da configuração assimétrica de proliferação celular observada no epitélio bucal normal (GONZALES-MOLES et al., 2014).

Avaliando a atividade proliferativa das células no processo de transformação maligna do epitélio labial, nossos resultados mostraram que a taxa máxima de proliferação celular foi observada nas camadas basal e suprabasal do epitélio de toda a amostra analisada. Diferentemente do grupo controle, as queilites actínicas apresentaram expressão de Ki-67 no terço médio, e os carcinomas espinocelulares de lábio na região tumoral interna (Tabela 5), porém nestas regiões essa expressão de Ki-67 foi muito discreta e, provavelmente, tem pouca relevância na oncogênese labial.

Voltando a avaliar a expressão de Ki-67 na camada basal do epitélio labial, observou-se uma expressão crescente à medida que aumentava a desorganização epitelial dos grupos de queilite actínicas para carcinomas espinocelulares de boca. Assim, o nível máximo de expressão de Ki-67 foi encontrado na camada basal dos carcinomas espinocelulares de lábio (58,4%) e o nível mínimo na camada basal dos queratinócitos controles (14,4%), sendo estas diferenças estatisticamente significativas, como pode ser observado na Tabela 5. Entretanto, na camada suprabasal do epitélio labial, mesmo com uma alta expressão de Ki-67, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (Tabela 5).

Esse padrão de expressão apresentado pelo Ki-67 no presente estudo confirma que no processo de carcinogênese labial, a proliferação epitelial maligna parece ter uma maior relevância na camada basal, onde provavelmente encontram-se os queratinócitos que armazenam as principais alterações genéticas induzidas pela radiação solar. Assim, essas células da camada basal, instáveis genomicamente, tornam-se alvos para a aquisição de novos eventos oncogênicos, transformando-se em células epiteliais malignas (GONZALEZ-MOLES et al., 2014).

Analizando o padrão de proliferação do epitélio bucal normal (grupo controle), observamos que este segue o padrão assimétrico da proliferação fisiológica. Neste padrão fisiológico, as células progenitoras localizadas na camada basal são responsáveis pela renovação do epitélio (GONZALEZ-MOLES et al., 2014). Estas células progenitoras desenvolvem-se lentamente, assim a baixa taxa de proliferação resulta em baixos níveis de expressão de Ki-67, como pode ser observado na camada basal do grupo controle (14,4%) deste estudo. Cada célula progenitora da camada basal divide-se assimetricamente em uma célula-filha com capacidade idêntica de proliferação e em uma célula transitória com um número limitado de divisões. A célula transitória é capaz de amplificar de forma rápida a divisão em três e cinco vezes até que todas as células filhas alcancem a diferenciação terminal (GONZALEZ-MOLES et al., 2014).

No entanto, ao observarmos, em nosso estudo, que a expressão de Ki-67 na camada basal aumentou à medida que aumentou o transtorno epitelial, ficou evidente que o padrão assimétrico da proliferação fisiológica foi perdido durante a transformação maligna do epitélio labial e que as células progenitoras localizadas na camada basal provavelmente são as responsáveis por essa transformação. De acordo com Gonzalez-Moles et al. (2014), as células progenitoras, as quais apresentam baixa taxa de proliferação e permanecem por um longo período no epitélio, seriam capazes de abrigar eventos oncogênicos necessários para a transformação maligna. Esses eventos oncogênicos alterariam o padrão assimétrico da proliferação, ou seja, uma célula progenitora deixaria de gerar uma célula-filha idêntica e uma célula transitória, e passaria a gerar duas células-filhas idênticas, iniciando assim uma população de células progenitoras alteradas geneticamente, que ocupariam o lugar das células progenitoras normais da camada basal. Portanto, o aumento da expressão de Ki-67 observado na camada basal à medida que aumentou o grau de displasia epitelial, reforça que um maior número de células progenitoras alteradas geneticamente estão em proliferação. Assim sendo, o aumento da taxa de proliferação na camada basal das queilites actínicas e dos carcinomas espinocelulares de lábio, identificados no presente estudo pelo Ki-67, pode ser considerado um fator de risco para transformação maligna na região labial.

Estudos recentes (GONZÁLEZ-MOLES et al., 2010; GONZÁLEZ-MOLES; SCULLY; RUIZ-AVILLA, 2012) avaliando epitélios não-tumorais adjacentes,

ressaltaram que as células transitórias também podem abrigar eventos oncogênicos que podem levar ao desenvolvimento de células malignas. Os autores encontraram uma elevada taxa de proliferação suprabasal nos epitélios não-tumorais dos pacientes que desenvolveram mais de um tumor e sugeriram que quando o Ki-67 estiver expresso em mais de 50% das células suprabasais na mucosa bucal, poderia indicar um maior risco do desenvolvimento de tumores malignos múltiplos (GONZÁLEZ-MOLES et al., 2010; GONZÁLEZ-MOLES; SCULLY; RUIZ-AVILLA, 2012).

Entretanto, esta teoria descrita acima não foi ainda confirmada na carcinogênese labial e estudos futuros deveriam investigar os epitélios próximos as regiões de queilites actínicas visando determinar se as células geneticamente modificadas na camada suprabasal também aumenta o risco do desenvolvimento de câncer de lábio.

A análise geral de nossos resultados confirma que β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 participam da carcinogênese labial e constituem biomarcadores preditivos para o câncer de lábio. Além disso, embora a β -catenina e ciclina D1 participem da mesma via de sinalização/Wnt, nossos resultados indicam que, na carcinogênese labial, estes biomarcadores são expressos a partir de eventos oncogênicos independentes.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Após analisar a expressão de β -catenina, ciclina D1 e Ki-67 no processo de transformação maligna labial pode-se concluir que:

- ✓ a expressão membranosa de β -catenina foi totalmente positiva no epitélio labial normal, sofrendo uma perda discreta na camada basal das queilites actínicas com displasia epitelial intensa (Cis) e nos carcinomas espinocelulares de lábio;
- ✓ a expressão citoplasmática e nuclear de β -catenina foi negativa no epitélio labial normal, apresentando uma expressão discreta e diretamente proporcional à displasia epitelial nas camadas basal e suprabasal das queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio;
- ✓ houve um aumento da expressão de ciclina D1 na camada basal a medida que aumentou a intensidade da displasia epitelial, confirmando a participação do oncogene ciclina D1 na carcinogênese labial;
- ✓ as expressões nucleares de β -catenina e de ciclina D1, no processo de transformação maligna labial, parecem ocorrer por uma combinação de eventos independentes;
- ✓ o aumento da taxa de proliferação celular demonstrado por meio da expressão de Ki-67, nas camadas basal e suprabasal foi diretamente proporcional ao aumento da displasia epitelial indicando que este pode ser considerado um fator de risco para a transformação maligna labial.

Nossos resultados reforçam que a β -catenina, a ciclina D1 e o Ki-67 podem ser utilizados como biomarcadores preditivos para o câncer de lábio. Além disso, sugerem que a β -catenina e a ciclina D1 participam da carcinogênese labial, em eventos oncogênicos independentes da via de sinalização/Wnt.

Referências

REFERÊNCIAS

ACKERMAN, A. B.; MONES, J. M. Solar (actinic) keratosis in squamous cell carcinoma. **Br J Dermatol**, v. 155, n. 1, p. 9-22, July 2006.

ARCE, L.; YOKOYAMA, N. N.; WATERMAN, M. L. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. **Oncogene**, v. 25, n. 57, p. 7492-504, Dec. 2006.

ATCHA, F. A. et al. A unique DNA binding domain converts T-cell factors into strong Wnt effectors. **Mol Cell Biol**, v. 27, n. 23, p. 8352-8363, Dec. 2007.

BALASUNDARAM, P. et al. Study of β -catenin, E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma with and without lymph node metastases. **Diagn Pathol**, v. 21, n. 9, p. 145, July 2014.

BARAKAT, C. β -Catenin Alterations in Squamous Cell Carcinoma of the Lip. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n. 13, p. 5187-5190, 2015.

BARNES, L. et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005.

BILKAY, U. et al. Management of lower lip cancer: a retrospective analysis of 118 patients and review of the literature. **Ann Plast Surg**, v.50, n.1, p.43-50, Jan. 2003.

BOUQUOT, J.; SPEIGHT, P. M.; FARTHING, P. M. Epithelial Dysplasia of the Oral Mucosa – diagnostic problems and prognostic features. **Current Diagnostic Pathology**, v. 12, p. 11-12, 2006.

BOVOLENTA, P. et al. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. **J Cell Sci**, v. 15, n. 121, p. 737-746, Mar. 2008.

CAI, Z. G. et al. β -catenin expression pattern in primary oral squamous cell carcinoma. **Chin Med J**, v. 121, n. 19, p. 1866-1870, Oct. 2008.

CHI, H. miR-194 regulated AGK and inhibited cell proliferation of oral squamous cell carcinoma by reducing PI3K-Akt-FoxO3a signaling. **Biomed Pharmacother**, v. 71, p. 53-57, Apr. 2015.

DO, N. Y.; PARK, S. Y.; LIM, S. C. The role of E-cadherin/beta-catenin complex and cyclin D1 in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res Treat**, v. 36, n. 1, p. 72-78, Feb. 2004.

FABBROCINI, G. et al. p53, cyclin-D1, PCNA, AgNOR expression in squamous cell cancer of the lip: a multicenter study. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 16, n. 4, p. 172-177, Aug. 2000.

FERRAZZO, K. L. et al. Differential expression of galectin-3, beta-catenin, and cyclin D1 in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma of salivary glands. **J Oral Pathol Med**, v. 38, n. 9, p. 701-707, Oct. 2009.

FU, X.; FENG, Y. QKI-5 suppresses cyclin D1 expression and proliferation of oral squamous cell carcinoma cells via MAPK signalling pathway. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, n. 5, p. 562-567, May 2015.

GALE, N. et al. Epithelial precursor lesions. World Health Organization Classification of tumours. pathology and genetics: head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005.

GARCIA, N. G. et al. Loss of cytokeratin 10 indicates malignant transformation in actinic cheilitis. **Clin Oral Investig**, v. 20, n. 4, p. 745-752, May. 2016.

GILLES, C. et al. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. **Cancer Res**, v. 63, n. 10, p. 2658-2664, May 2003;

GONZALES-MOLES, M. A. et al. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. **Head Neck**, v. 22, n. 7, p. 658-661, Oct. 2000.

GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. Ki-67 expression in non-tumour epithelium adjacent to oral cancer as risk marker for multiple oral tumours. **Oral Diseases**, v. 16, n. 1, p. 68-75. Jan. 2010.

GONZALEZ-MOLES, M. A.; SCULLY, C.; RUIZ-AVILA, I. Molecular findings in oral premalignant fields: update on their diagnostic and clinical implications. **Oral Dis**, v. 18, n. 1, p. 40-47, Jan. 2012.

GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. Asymmetrical proliferative pattern loss during malignant transformation of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med**, v. 43, n. 7, p. 507-13, Aug. 2014a.

GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. β -catenin in oral cancer: an update on current knowledge. **Oral Oncol**, v. 50, n. 9, p. 818-824, Sept. 2014b.

GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. Implications of Differential Expression of β -Catenin in Oral Carcinoma. **Anticancer Res**, v. 36, n. 4, p. 1599-1604, Apr. 2016.

HANEMANN, J. A. et al. Expression of E-cadherin and β -catenin in basaloid and conventional squamous cell carcinoma of the oral cavity: are potential prognostic markers? **BMC Cancer**, v. 3, n. 14, p. 395, June 2014.

HASSON, O. Squamous cell carcinoma of the lower lip. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 6, p. 1259-1262, June 2008.

HENDERSON, B. R.; FAGOTTO, F. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. **EMBO Rep**, v. 3, n. 9, p. 834-839, Sept. 2002.

HOPPLER, S.; KAVANAGH, C. L. Wnt signalling: variety at the core. **J Cell Sci**, v. 1, n. 120, p. 385-393, Feb. 2007.

HORTA, M. C. R. et al. P53 and p21 WAF1/CIP1 overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 36, n. 2, p. 88-92, Feb. 2007.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

ISHIDA, K. et al. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. **Mol Cancer**, v. 9, n. 6, p. 62, Oct. 2007.

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. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 131, n. 12, p. 773-782, Dec. 2005.

JADOTTE, Y. T.; SCHWARTZ, R. A. Solar cheilosis: an ominous precursor: part I. Diagnostic insights. **J Am Acad Dermatol**, v. 66, n. 2, p. 173-184, Feb. 2012.

JAMIESON, C.; SHARMA, M.; HENDERSON, B. R. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 6, p. 847-850, June 2012.

JAWORSKA, M. et al. Prognostic molecular markers in oral and lip squamous cell carcinoma--evaluation of expression and its significance. **Otolaryngol Pol**, v. 62, n. 2, p. 175-181, 2008.

JIA, L. F. et al. Prognostic implications of microRNA miR-195 expression in human tongue squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. 56634, Feb. 2013.

JIA, L. F. et al. miR-375 inhibits cell growth and correlates with clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v. 33, n. 4, p. 2061-2071, Apr. 2015.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1420-1428, June 2009.

KAUR, J. et al. Clinical Significance of Altered Expression of b-Catenin and E-Cadherin in Oral Dysplasia and Cancer: Potential Link with ALCAM Expression. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. 67361, June 2013.

KORNEVS, E. et al. 5 year experience with lower lip cancer. **Stomatologija**, v. 7, n. 3, p. 95-98, 2005.

KUJAN, O. et al. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: An attempt to understand the sources of variation. **Oral Oncology**, v. 43, n. 3, p. 224-231, Mar. 2007.

LAXMIDEVI, L. B. et al. Aberrant β -catenin expression in the histologic differentiation of oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: an immunohistochemical study. **J Oral Sci**, v. 52, n. 4, p. 633-640, Dec. 2010.

LEFFELL, D. L. The scientific basis of skin cancer. **J Am Acad Dermatol**, v. 42, p. 518-522, Jan. 2000.

LILL, C. et al. Correlation of β -catenin, but not PIN1 and cyclin D1, overexpression with disease-free and overall survival in patients with cancer of the parotid gland. **Head Neck**, v. 37, n. 1, p. 30-36, Jan. 2015.

LIU, F.; MILLAR, S. E. Wnt/beta-catenin signaling in oral tissue development and disease. **J Dent Res**, v. 89, n. 4, p. 318-330, Apr. 2010.

LO MUZIO, L. et al. Beta- and gamma-catenin expression in oral dysplasia. **Oral Oncol**, v. 45, n. 6, p. 501-4, June 2009.

LOPES, F. F. et al. Changes in immunoexpression of E-cadherin and beta-catenin in oral squamous cell carcinoma with and without nodal metastasis. **Ann Diagn Pathol**, v. 13, n. 1, p. 22-29, Feb. 2009.

MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Dev Cell**, v. 17, n. 1, p. 9-26, July 2009.

MAHOMED F.; ALTINI, M.; MEER, S. Altered E-cadherin/beta-catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. **Oral Dis**, v. 13, n. 4, p. 386-392, July 2007.

MARTÍNEZ, A. et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. **J Oral Pathol Med**, v. 34, n. 5, p. 257-262, May 2005.

MENTA SIMONSEN NICO, M.; RIVITTI, E. A.; LOURENÇO, S. V. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. **J Cutan Pathol**, v. 34, n. 4, p. 309-314, Apr. 2007.

MISHRA, R.; NAGINI, S.; RANA, A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 α / β and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. **Mol Cancer**, v. 3, n. 14, p. 20, Feb. 2015.

MOON, R. T. et al. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 9, p. 691-701, Sept. 2004.

ODAJIMA, T. et al. Abnormal beta-catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki-67 labeling index, and clinicopathological features. **Hum Pathol**, v. 36, n. 3, p. 234-241, Mar. 2005.

RAMASUBRAMANIAN, A. et al. Immunohistochemical evaluation of oral epithelial dysplasia using cyclin-D1, p27 and p63 expression as predictors of malignant transformation. **J Nat Sci Biol Med**, v. 4, n. 2, p. 349-358, July 2013.

RENA, W. et al. Surgical management of Squamous Cell Carcinoma of the lower lip: An experience of 109 cases. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 19, n. 4, p. 398-402, July 2014.

REYES, M. et al. Increased nuclear β -catenin expression in oral potentially malignant lesions: A marker of epithelial dysplasia. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 20, n. 5, p. 540-546, Sept. 2015.

RODOLICO, V. et al. Overexpression of cyclin D1 and interaction between p27Kip1 and tumour thickness predict lymph node metastases occurrence in lower lip squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 41, n. 3, p. 268-275, Mar. 2005.

ROSADO, P. et al. E-cadherin and β -catenin expression in well-differentiated and moderately-differentiated oral squamous cell carcinoma: relations with clinical variables. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 51, n. 2, p. 149-156, Mar. 2013.

ROSSI, R.; MOR, M.; LOTT, T. Actinic keratosis. **Int J Dermatol**, v. 46, n. 9, p. 895-904, Sept. 2007.

SALES, K. U. et al. Cyclin D1-induced proliferation is independent of beta-catenin in head and neck cancer. **Oral Dis**, v. 20, n. 3, p. 42-48, Apr. 2014.

SANTARIUS, T. et al. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 1, p. 59-64, Jan. 2010.

SANTORO, A. et al. Beta-catenin and epithelial tumors: a study based on 374 oropharyngeal cancers. **Biomed Res Int**, Jan. 2014.

SATHYAN, K. M.; NALINAKUMARI, K. R.; KANNAN, S. H-Ras mutation modulates the expression of major cell cycle regulatory proteins and disease prognosis in oral carcinoma. **Mod Pathol**, v. 20, n. 11, p. 1141-1148, Nov. 2007.

SCHUSSEL, J. L.; PINTO DDOS, S. JR.; MARTINS, M. T. Altered β -catenin expression related to cancer progression on actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. **Ann Diagn Pathol**, v. 15, n. 1, p. 1-5, Feb. 2011.

SHAH, A. Y.; DOHERTY, S. D.; ROSEN, T. Actinic cheilitis: a treatment review. **Int J Dermatol**, v. 49, n. 11, p. 1225-1234, Nov. 2010.

SHIRATSUCHI, H. et al. Beta-Catenin nuclear accumulation in head and neck mucoepidermoid carcinoma: its role in cyclin D1 overexpression and tumor progression. **Head Neck**, v. 29, n. 6, p. 577-584, June 2007.

SILVA, B. S. et al. Altered β -catenin expression in oral mucosal dysplasia: a comparative study. **J Appl Oral Sci**, v. 23, n. 5, p. 472-478, Oct. 2015.

SOARES, M. Q. et al. E-cadherin, β -catenin, and $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrin expression in primary oral squamous cell carcinoma and its regional metastasis. **Histol Histopathol**, v. 30, n. 10, p. 1213-1222, Oct. 2015.

SOUZA, L. R. et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: Epidemiological study and clinicopathological associations. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 16, n. 6, p. 757-762, Sept. 2011.

TAKEDA, T. et al. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 6, p. 369-375, July 2006.

TANAKA, N. et al. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v. 89, n. 3, p. 557-563, Aug. 2003.

TIAN, X. et al. E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. **J Biomed Biotechnol**, Oct. 2011.

URAGUCHI, M. et al. Activation of WNT family expression and signaling in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **J Dent Res**, v. 83, n. 4, p. 327-332, Apr. 2004.

VAN DER WEYDEN, L. et al. Acute sensitivity of the oral mucosa to oncogenic K-ras. **J Pathol**, v. 224, n. 1, p. 22-32, May 2011.

XAVIER, F. C. et al. WNT-5A, but not matrix metalloproteinase 3 or beta-catenin protein, expression is related to early stages of lip carcinogenesis. **J Oral Pathol Med**, v. 38, n. 9, p. 708-715, Oct. 2009.

ZAID, K. W. Immunohistochemical assessment of E-cadherin and β -catenin in the histological differentiations of oral squamous cell carcinoma. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 20, p. 8847-8853, 2014.

WANG, L. et al. Association between Cyclin D1 polymorphism and oral cancer susceptibility: a meta-analysis. **Tumour Biol**, v. 35, n. 2, p. 1149-1155, Feb. 2014.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 3, p. 127-133, Mar. 2008.

WOOD, N. H. et al. Actinic Cheilitis: A case report and review of the literature. **Eur J Dent**, v. 5, n. 1, p. 101-106, Jan. 2011.

YANG, Y. et al. Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis. **BMC Cancer**, v.19, n.13, p.129, Mar. 2013.

YANG, K. et al. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. **Lab Invest**, v. 96, n. 2, p. 116-136, Feb. 2016.

YU, Z. et al. Cyclin d1 is a valuable prognostic marker in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 3, p. 1160-1166, Feb. 2005.

Anexo

Anexo A – Aprobación do Comité de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de Granada (Espanha)

Universidad
de Granada

Vicerrectorado de Política Científica e Investigación

**COMITE DE ETICA EN INVESTIGACION
DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

La Comisión de Ética en Investigación de la Universidad de Granada, analizado el informe preliminar del Presidente del Comité en Investigación Humana, emite informe favorable a la metodología en la investigación titulada 'EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE β -CATENINA Y CICLINA D1 COMO BIOMARCADORES PREDICTIVOS PARA EL CARCINOMA DEL LABIO' que dirige D./Dña. NATALIA GALVÃO GARCIA, con NIF Y3646936R, quedando registrada con el nº: 191/CEIH/2016.

Granada, a 04 de Julio de 2016.

EL PRESIDENTE
Fdo: Enrique Herrera Viedma

EL SECRETARIO
Fdo: Fernando Cornet Sánchez del Águila