CARLOS EDUARDO MOLINARI NARDI

O papel da via proteica Wnt em carcinomas de laringe

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Rogério Aparecido Dedivitis**

São Paulo

2017

CARLOS EDUARDO MOLINARI NARDI

O papel da via proteica Wnt em carcinomas de laringe

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Rogério Aparecido Dedivitis**

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nardi, Carlos Eduardo Molinari

O papel da via proteica Wnt em carcinomas de laringe / Carlos Eduardo Molinari Nardi. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Rogério Aparecido Dedivitis.

Descritores: 1.Caderinas 2.Beta caterina 3.Laringectomia 4.Neoplasias laríngeas 5.Carcinoma 6.Células epiteliais

USP/FM/DBD-366/17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da casuística de acordo com variáveis demográficas e clínicas dos 45 pacientes.....	22
Tabela 2 - Distribuição da casuística de acordo com: Expressão de E-caderina e β -catenina – 45 casos.....	23
Tabela 3 - Distribuição da casuística de acordo com a expressão de E-caderina.....	24
Tabela 4 - Distribuição da casuística de acordo com a expressão de β -catenina	25
Tabela 5 - Relação entre o sítio tumoral com a expressão de E-caderina.....	26
Tabela 6 - Relação entre o sítio tumoral e a expressão de β -catenina.....	26
Tabela 7 - Probabilidade de sobrevida global a 5 anos (n = 45)	27
Tabela 8 - Probabilidade de sobrevida livre de recidiva a 5 anos.....	28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Probabilidade de sobrevida global por expressão

β -catenina 29

Gráfico 2 – Probabilidade de sobrevida livre de recidiva por

expressão E-caderina..... 30

Gráfico 3 – Probabilidade de sobrevida livre de recidiva

por expressão β -catenina..... 30

RESUMO

Nardi CEM. *O papel da via proteica Wnt em carcinomas de laringe* [Dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Introdução: O câncer de laringe é a segunda neoplasia maligna mais comum no segmento cervicofacial. As caderinas epiteliais (E-caderinas) em conjunto com cateninas formam o complexo E-caderina-catenina que atuam na adesão célula-célula. A perda dessa molécula pode levar à redução ou até mesmo ausência de expressão de E-caderina na membrana celular, acúmulo citoplasmático de β -catenina e sua translocação para o núcleo, contribuindo para eventos carcinogênicos. **Objetivo:** Avaliar a expressão de E-caderina e β -catenina em pacientes com tumor laríngeo precoce ou avançado e na presença ou ausência de metástase cervical. **Métodos:** Realizou-se estudo retrospectivo de 52 pacientes portadores de carcinoma epidermoide glótico ou supraglótico, tratados entre 1998 a 2011 e avaliados de acordo com o sítio de localização tumoral, grau de diferenciação histológica, estágio TNM, dados de sobrevida e confrontados com a expressão imunoistoquímica de E-caderina e β -catenina. **Resultados:** Observou-se associação com significância estatística entre a queda da expressão de E-caderina com a localização supraglótica da lesão, a presença de metástase cervical, em tumores pouco diferenciados e em tumores localmente avançados quando em topografia glótica. Com relação à expressão de β -catenina, também foi encontrada significância estatística ao relacionar a presença de metástase cervical e tumor de baixa diferenciação com a diminuição de expressão deste marcador. Quanto à análise de sobrevida, a baixa expressão de β -catenina está relacionada a pior sobrevida global e a redução da expressão de ambos os marcadores a pior sobrevida livre de doença. **Conclusão:** A expressão anômala dos marcadores estudados levam a impacto prognóstico por poder propiciar tumores com maior agressividade local e presença de metástase cervical.

Descritores: caderinas; beta catenina; laringectomia; neoplasias laríngeas; carcinoma; células escamosas

ABSTRACT

Nardi CEM. *The role of the Wnt protein pathway in laryngeal cancer* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Introduction: Larynx cancer is the second most common malignant neoplasm in the cervicofacial segment. Epithelial cadherins (E-cadherins) together with catenins form the E-cadherin-catenin complex that acts on cell-to-cell adhesion. The loss of this molecule may lead to the reduction or even absence of E-cadherin expression in the cell membrane, cytoplasmic accumulation of β -catenin and its translocation to the nucleus, contributing to carcinogenic events. **Objective:** To evaluate the expression of E-cadherin and β -catenin in patients with laryngeal tumor in different locoregional situations. **Methods:** A study retrospective of 52 patients with glottic or supraglottic squamous cell carcinoma treated between 1998 and 2011 was conducted, evaluated according to the tumor localization site, the degree of histological differentiation, TNM stage and survival analysis. These data were confronted with the immunohistochemical expression of E-cadherin and β -catenin. **Results:** We observed statistically significant association between the fall of E-cadherin expression and the supraglottic localization of the lesion, the presence of cervical metastasis, poorly differentiated tumors and locally advanced tumors when in glottic topography. Related to the expression of β -catenin, statistical significance was also found for the presence of cervical metastasis and tumor of low differentiation with the decreased expression of this marker. Regarding survival analysis, the low expression of β -catenin is related to worse overall survival and the reduction of expression of both markers to worse disease-free survival. **Conclusion:** The anomalous expression of the markers studied leads to a prognostic impact in order to provide tumors with greater local aggressiveness and presence of cervical metastasis.

Descriptors: cadherins; beta catenin; laryngectomy; laryngeal neoplasms; carcinoma; squamous cell

Essa dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha,

Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	7
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
4 MÉTODOS.....	14
4.1 Casuística.....	15
4.2 Análise histopatológica.....	16
4.3 Análise imunoistoquímica.....	16
4.4 Análise estatística.....	18
5 RESULTADOS	20
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	36
8 ANEXOS	38
9 REFERÊNCIAS	41
10 APÊNDICE	48

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer de laringe é a segunda neoplasia maligna mais comum no segmento cervicofacial. Acomete o gênero masculino na razão de 3,5:1 em relação ao feminino. Esses tumores, quando diagnosticados, por vezes apresentam-se em estádios clínicos avançados¹, com significativa morbi-mortalidade. Dados clínicos referentes à sobrevida a cinco anos sustentam a existência de comportamentos clínicos desiguais entre carcinomas de sítios anatômicos diferentes na laringe. Embriologicamente, a laringe é subdividida em três partes: glote, supraglote e infraglote. O agente etiológico comumente implicado em mais de 85-90% dos casos é o tabaco, sendo que, para os carcinomas de supraglote, o álcool tem grande importância. Tais substâncias atuam de forma sinérgica na etiopatogenia dessas neoplasias. As neoplasias de laringe apresentam incidência maior a partir da sexta e sétima décadas de vida. O câncer glótico é mais propenso a ser detectado precocemente porque mesmo pequenas lesões produzem alterações de voz. A lesão em supraglote tende a ser localmente mais silenciosa porque os tumores não afetam a voz até que sejam significativamente avançados. Os pacientes apresentam odinofagia ou otalgia mais tardiamente¹⁻³. A supraglote apresenta uma profusa rede de vasos linfáticos e, portanto, maior probabilidade para a disseminação regional. Dessa forma, o câncer da região supraglótica da laringe é mais propenso a apresentar metástase cervical regional no momento do diagnóstico do que o câncer glótico. Assim, pacientes com carcinoma epidermoide (CEC) supraglótico geralmente se apresentam com lesões mais avançadas, bem como com pior prognóstico em comparação a pacientes com CEC glótico. A presença de metástase linfonodal determina o tratamento e prognóstico dos pacientes com CEC supraglótico, diminuindo a sobrevida esperada em até 50%^{4,5}.

Pacientes com carcinoma de laringe e linfonodos clinicamente negativos podem apresentar metástases ocultas ao exame histopatológico³⁻⁵. As técnicas de diagnóstico por imagem, como ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética, podem detectar a presença de metástases linfonodais macroscópicas, mas lesões microscópicas não são avaliadas apropriadamente⁶.

Em 1980, em um estudo conduzido por Nusslein-Volhard & Wieschaus⁷, foi isolado o gene Wg influenciando o desenvolvimento embrionário em *Drosophila melanocaster*. Dois anos depois, o gene Int-1 foi descrito em ratos e sua mutação levava a tumores mamários. Posteriormente, foi descoberto que Int-1 codificava um homólogo do gene Wg e toda a família de proteínas originária desses genes foi denominada Wnt, uma junção neurolinguística de Wg com Int. A importância na oncogênese, no desenvolvimento embrionário e a persistência dos genes em diferentes espécies estimularam a pesquisa no campo da sinalização Wnt. A primeira associação em humanos foi descrita em 1990, relacionada ao câncer colorretal⁸.

Proteínas Wnt são uma grande família de glicoproteínas secretadas que ativam vias de transdução de sinais para controlar uma grande variedade de processos celulares: determinação do destino da célula, bem como sua polaridade, proliferação e migração. Existem três vias de sinalização associadas com a interação de receptores Wnt. A primeira, chamada de via canônica, envolve a β -catenina como molécula alvo e é responsável pela sua regulação. As outras duas vias são não canônicas, representadas pela via WntCa²⁺ e a via de polaridade celular planar⁹.

A via Wnt regula a capacidade de acúmulo da β -catenina no núcleo e de sua ligação aos componentes do *DNA-binding T-cell factor/Lymphoid enhancer factor*

da família Tcf/Lef⁹. Esse complexo converte os repressores transcricionais da família Tcf/Lef (Tcf, Lef, Tcf3 e Tcf4) para ativadores de genes alvo, inclusive c-Myc e ciclina D1. Uma característica da ativação da via Wnt é a acumulação nuclear de seu principal efetor, a β -catenina, componente de ativação transcricional complexo que inclui membros da família de proteínas de ligação Tcf/Lef¹⁰.

Na via canônica de sinalização Wnt, na ausência de sinais da via Wnt, a β -catenina é ligada pelos supressores de tumor APC e axina1/axina2, formando junto com as quinases o complexo de destruição que, sequencialmente, fosforila os resíduos de serina e treonina no N terminal da β -catenina. Isso resulta no direcionamento da β -catenina para a degradação proteossomal e, consequentemente, seus níveis livres permanecem baixos. Nesse cenário, Tcf/Lef atua no núcleo como repressor transcricional¹¹.

Caderinas são um grupo de moléculas de adesão dependentes de cálcio que permitem a interação homotípica célula-célula, embora ligações heterotípicas entre diferentes moléculas de caderina sejam também possíveis. Elas desenvolvem um papel essencial na morfogênese, agregação e desagregação celular, participando, posteriormente, nas cascatas de transdução de sinal. Caderinas atuam nas interações de adesão célula-célula sempre na presença de íons de cálcio¹²⁻¹⁴.

As caderinas epiteliais (E-caderinas) são expressas em todos os tecidos epiteliais humanos e concentram-se em locais de contato epitelial célula-célula, provado por meio de estudo imunoistoquímico¹⁵. Já as cateninas estão envolvidas na regulação das caderinas. As cateninas do tipo β e γ fazem ligação direta com a porção citoplasmática da E-caderina.

A formação do complexo E-caderina-catenina é necessária para a adesão celular normal. Essa aderência celular apresenta-se reduzida ou até mesmo

ausente em casos de câncer, comprovada pela análise da expressão celular de E-caderina. A perda da E-caderina pode contribuir para a ocorrência de eventos carcinogênicos, como a perda do controle sobre o crescimento e proliferação celular. Além da β -catenina fazer parte do complexo de adesão E-caderina, ela tem papel essencial como mediador da via de transdução de sinal Wnt que ativa os fatores de transcrição *DNA-binding T-cell factor/lymphoid enhancer factor* (Tcf/Lef) que, por sua vez, controlam a transcrição de genes que controlam o ciclo celular ou ainda a transcrição de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases. A perda da molécula E-caderina leva ao acúmulo citoplasmático de β -catenina e sua translocação para o núcleo, estimulando a proliferação celular e invasão de células epiteliais. Foi observada uma correlação negativa entre a expressão da E-caderina e a diferenciação tumoral. Tumores bem ou moderadamente diferenciados mantêm a expressão da E-caderina, em contrapartida aos tumores pouco diferenciados¹⁶.

A perda da adesão celular associada à diminuição dos níveis de E-caderina leva a um aumento da tendência a disseminação adjacente ou linfonodal¹⁷⁻¹⁹. Foi demonstrado que a redução na expressão de E-caderinas em espécimes de CEC de laringe poderiam sugerir o risco de metástase linfonodal oculta em pacientes clinicamente negativos²⁰. Dessa forma, questiona-se se a pesquisa de E-caderina poderia ser realizada a partir de material proveniente de biópsias, porém, estudos comprovam que a expressão da proteína não foi semelhante à encontrada na análise do espécime cirúrgico provavelmente devido à heterogeneidade do tumor²¹.

Na avaliação do tamanho do tumor primário, da classificação linfonodal e do número de linfonodos acometidos, não houve significância estatística quando correlacionados à expressão de E-caderinas, contudo, existe significância quando comparados com a evolução favorável²²⁻²⁴.

O gene humano da E-caderina está localizado no cromossomo 16q22^{25,26}, uma região sujeita a translocação cromossômica nos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço²⁷. A molécula E-caderina tem o potencial de atuar como gene supressor tumoral. Embora não seja a única molécula responsável pela invasão tumoral e aparecimento de metástases, alterações em sua expressão contribuem para a liberação celular do tumor e, consequente, invasão²⁸.

A determinação imunoistoquímica da manifestação da E-caderina e β -catenina no tumor primário parece ser útil na identificação de pacientes com pescoço clinicamente negativo que são considerados de risco para metástases ocultas e que necessitariam de tratamento adicional, embora suas expressões não representem o único fator para a geração de metástases e a sua aplicação ainda não esteja bem definida.

Alguns estudos falharam em demonstrar uma relação estatística significativa entre a expressão anormal da E-caderina e as características clínico-histológicas do tumor. Dessa forma, ainda não está claro se a diminuição da expressão da E-caderina afeta o comportamento tumoral e, portanto, novas investigações para confirmar se o complexo E-caderina/catenina teriam importância na decisão clínica são necessárias.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Avaliar a influência da modificação da expressão de E-caderina e β -catenina em pacientes portadores:

- de tumor laríngeo precoce ou avançado
- e na presença ou ausência de metástase cervical

3. REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

Franchi *et al.*²⁰ investigaram, em 1996, 30 pacientes tratados devido a câncer de laringe com metástases cervicais ocultas e outros 30 casos sem a presença clínica e histológica de metástase cervical. Encontraram associação significativa entre a redução da expressão de E-caderina e a presença de metástase cervical oculta ($p = 0,006$) e de tumores menos diferenciados ($p = 0,001$), resultando em um fenótipo mais agressivo e com tendência a disseminação.

Liu *et al.*²⁹, em 1997, avaliaram a expressão de E-caderina em 38 pacientes com CEC glótico e 10 casos de pólipos vocais como controle não neoplásico. Encontraram significância estatística quanto ao grau de diferenciação histológica ($p = 0,018$) com perda de expressão nos tumores pouco diferenciados. Não houve perda ou redução de expressão nos casos de pólipos vocais.

Rodrigo *et al.*², em 2002, avaliaram 101 pacientes com CEC supraglótico quanto à diferença de expressão de E-caderina em relação ao estágio T ($p = 0,09$), grau histológico ($p = 0,89$) e estágio N, encontrando redução de expressão nos casos com metástase cervical ($p = 0,007$) e levando a redução da taxa de sobrevida livre de doença ($p = 0,0002$).

Lopez-Gonzalez *et al.*³⁰, avaliando 38 casos de CEC de laringe em 2004, observaram associação significativa entre o aumento de expressão citoplasmática de β -catenina e a diminuição da expressão na membrana celular com tumores pouco diferenciados ($p = 0,0001$).

Rodrigo *et al.*³¹, em 2007, investigaram 101 pacientes com CEC supraglótico, não encontrando significância estatística quanto à classificação T e ao grau de diferenciação, no entanto, com significância quanto a metástase cervical nos casos de baixa expressão de E-caderina ($p = 0,006$).

Goulioumis *et al.*³² obtiveram uma correlação significativa entre a redução da expressão membranosa de β -catenina e a localização tumoral supraglótica ao analisar amostras de 97 pacientes com CEC de laringe ($p = 0,025$) no ano de 2010.

Em contrapartida, em 2011, Paksoy *et al.*³³ não encontraram significância entre a expressão de E-caderina e evolução com metástase cervical ao avaliarem 56 pacientes tratados por câncer de laringe ($p = 0,157$).

Carico *et al.*³⁴, em 2012, avaliaram a expressão de E-caderina em 55 pacientes com CEC precoce de laringe (T1 N0) e encontraram associação significativa entre a alta expressão e casos bem diferenciados ($p = 0,013$). Todos os carcinomas *in situ* avaliados mantiveram a alta expressão ($p = 0,006$). Não foi encontrada associação estatística com graus de diferenciação II e III, embora tenha ocorrido declínio da expressão com a desdiferenciação celular.

Galera Ruiz *et al.*³⁵, em 2012, examinaram 27 pacientes com CEC de laringe. A expressão de β -catenina ocorreu apenas na membrana em 89% dos casos de sítio glótico, já em 86% dos casos supraglóticos, a expressão ocorreu na membrana e no citoplasma ($p = 0,003$), podendo ser considerado um importante fator de invasão tumoral e metástase.

Li *et al.*³⁶, em 2012, obtiveram significância ao correlacionar a presença de metástase cervical com a redução na expressão da E-caderina ($p < 0,001$) em 64 pacientes com CEC glótico, supraglótico e infraglótico. Entre os diferentes sítios tumorais não houve significância. Na curva de Kaplan-Meier, o grupo de pacientes com alta expressão de E-caderina apresentou maior taxa de sobrevida a 5 anos ($p = 0,01$) e de sobrevida livre de doença ($p = 0,024$). Concluíram que a avaliação imunoistoquímica da expressão de E-caderina poderia ajudar a identificar os

pacientes com metástase cervical clinicamente negativa, porém, com elevado risco de metástase oculta.

Zvrko *et al.*³⁷, em 2012, avaliando 80 pacientes com câncer glótico e supraglótico, depararam com a presença de significância estatística entre a redução de expressão de E-caderina e a ocorrência de metástase cervical ($p = 0,025$) e ao estágio TNM avançado III e IV ($p = 0,014$). Não houve significância ao avaliar o sítio do tumor e a expressão do marcador.

Onder Akdeniz *et al.*³⁸, em 2013, concluíram, ao avaliar 38 pacientes com CEC de laringe, que a E-caderina é um preditor de diferenciação celular e metástase cervical, podendo ser considerado um indicador de bom prognóstico quando em alta expressão.

Starska *et al.*³⁹ estudaram a expressão genética e proteica da E-caderina em câncer de laringe em 2013. Avaliando 86 casos, encontraram baixos níveis em tumores invasivos ($p = 0,046$ e $p = 0,0002$, respectivamente), sugerindo uma associação da expressão de E-caderina com a progressão tumoral e invasão de estruturas adjacentes.

Ahmed *et al.*⁴⁰, em 2014, avaliaram 75 pacientes com tumores glóticos e supraglóticos, encontrando significância em relação à expressão de E-caderina e o sítio do tumor primário ($p = 0,02$), grau de diferenciação histológica ($p = 0,004$), metástase linfonodal ($p = 0,006$), invasão tumoral ($p = 0,001$), estágio TNM ($p = 0,001$) e recorrência tumoral ($p = 0,000$)

Psyrris *et al.*⁴¹, em 2014, investigaram 289 pacientes com câncer de laringe e analisaram a expressão de E-caderina e β -catenina. Tumores com aumento da expressão citoplasmática de ambos os marcadores experimentaram maior sobrevida em comparação à expressão apenas da β -catenina ($p = 0,03$). Uma

maior sobrevida livre de doença ocorreu em tumores que apresentavam aumento da expressão de E-caderina na membrana e no citoplasma ao invés da expressão unitária da E-caderina no citoplasma ($p = 0,01$). A perda ou redução da expressão de E-caderina na membrana leva à liberação da β -catenina ao citoplasma e, conseqüentemente, iniciação da sinalização Wnt e indução a proliferação celular e metastatização reduzindo os padrões de sobrevida.

Já Rodrigo *et al.*⁴², em 2014, demonstraram que a perda da expressão de E-caderina está correlacionada significativamente com o risco de metástase a distância ($p = 0,002$) em 88 casos estudados.

Cappellesso *et al.*⁴³, em 2015, compararam a expressão de E-caderina em 16 casos de pT3-4 pN0 com 21 casos de pT1-4 pN+. No grupo pN0, não houve associação com o grau de diferenciação ou recorrência, também no grupo pN+, a redução na expressão de E-caderina demonstrou apenas uma tendência ($p = 0,06$), contudo, não significativa.

Bayram *et al.*⁴⁴, em 2015, avaliaram o material de biópsia de 234 casos de CEC supraglótico. Não encontraram significância estatística quanto ao estágio tumoral ($p = 0,423$), diferenciação histológica ($p = 0,558$) e associação com metástase cervical ($p = 0,073$) em relação à expressão de E-caderina. Os resultados conflitantes podem estar relacionados a heterogeneidade tumoral e baixa representatividade nas biópsias.

Contrariamente, Greco *et al.*⁴⁵, em 2015, avaliaram 82 pacientes com CEC de laringe com estádios I a IVA. Foram associados o aumento de expressão citoplasmática de β -catenina, com maior sobrevida específica de doença ($p = 0,0007$) e de E-caderina, com menor sobrevida global ($p = 0,03$).

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1. Casuística

O estudo foi conduzido de maneira retrospectiva, analisando dados a partir dos prontuários de 52 pacientes.

Os critérios de inclusão foram: pacientes portadores de CEC de laringe glótico ou supraglótico; pacientes assistidos pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Ana Costa de Santos e da Irmandade Santa Casa da Misericórdia de Santos, entre os anos de 1998 a 2011; pacientes submetidos a laringectomia parcial ou total com ou sem esvaziamento cervical associado, baseando o tratamento aplicado no sítio cirúrgico e estágio T e N; procedimentos terapêuticos realizados pela mesma equipe de cirurgiões seguindo as mesmas técnicas e com intenção curativa.

Os critérios de exclusão foram: pacientes cujo tratamento fosse a radioterapia, associada ou não à quimioterapia; pacientes submetidos a procedimentos terapêuticos cirúrgicos e/ou oncológicos prévios nas vias aerodigestivas superiores; pacientes com baixa representatividade histológica em suas lâminas e blocos.

Os pacientes foram estadiados de acordo com o sistema TNM, oitava edição da *International Union Against Cancer* (UICC, 2017).

Os pacientes foram avaliados de acordo com a idade (medida em anos), gênero (masculino ou feminino), sítio tumoral (glótico ou supraglótico), estágio T (T1 a T4), estágio N (N0 e N+), estadiamento tumoral TNM e grau de diferenciação histológica (bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado).

Dados como a sobrevida livre de doença e sobrevida global também foram avaliados e quantificados em meses. Os dados citados foram confrontados com a expressão imunoistoquímica dos marcadores E-caderina e β -catenina.

4.2. Análise histopatológica

As lâminas foram obtidas por meio de blocos de parafina de pacientes tratados devido às afecções citadas e coradas com hematoxilina e eosina, com a finalidade de comprovar a representatividade do tumor no material a ser analisado. A análise histopatológica foi realizada por meio de microscópio óptico comum. Foi construído um bloco receptor de parafina de *tissue microarray* (*Beecher Instruments*, Silver Spring, MD) a partir das amostras originais (bloco doador), escolhendo-se e marcando-se de forma circular a área representativa da lesão, junto a médico patologista, com posterior coleta com agulha de 1,0mm de diâmetro (*TMArrayer punch* MP10-1,0mm). Todos os casos, previamente identificados, foram dispostos em ordem numérica crescente em seus respectivos grupos. Os cortes seriados foram de 3 μ m de espessura e fixados em lâminas de vidro. Foi feita a coloração dos cortes com hematoxilina e eosina.

4.3 Análise imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica consistiu na avaliação da expressão do anticorpo policlonal E-caderina (Clone 36, Ventana Medical Systems Inc.®) e β -catenina (Clone 14, Cell Marque®).

Essa análise foi obtida por meio dos cortes obtidos de blocos receptores de *tissue microarray*, de 3µm (por microtomia mecânica), que foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas em xilol e etanol, sendo submetidos à recuperação antigênica pelo calor com panela de pressão, utilizando-se tampão citrato 10mM pH 6.0. As lâminas foram revestidas por solução de silano a 4% (3-aminopropyl-triethoxi-silane, Sigma®, Saint Louis, EUA) diluído em acetona, utilizando-se o complexo estreptovidina- biotina-peroxidase (StreptoABC, Dako®) para obtenção das reações.

Com a obtenção dos cortes, a peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol imediatamente após resfriamento à temperatura ambiente, por 20 minutos, as lâminas foram lavadas em água destilada. Posteriormente ao bloqueio da peroxidase, deu-se a imersão em solução salina tamponada com fosfatos (PBS).

As lâminas foram incubadas com anticorpos primários. Posteriormente, foram incubadas com anticorpo secundário em titulação de 1:200.

A utilização da solução de Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), sensível à luz e contra coradas com hematoxilina de Harris(Merck®), revelaram as reações. As reações foram acompanhadas com identificação de controles positivos, na ausência de anticorpos primários e negativos, quando da ausência de anticorpos secundários.

Foi realizada a leitura das lâminas acompanhado por médico patologista e calculada a imunoexpressão de cada marcador através da contagem de mil células, incluindo tecido tumoral e tecido não neoplásico, em cada core do bloco de TMA confeccionado.

4.4 Análise estatística

A distribuição de frequências foi utilizada para descrever as variáveis categóricas (numero de casos e percentual) e as medidas de tendência central (média e mediana) e de variabilidade (mínimo, máximo e desvio padrão) para as numéricas.

Para verificar a associação entre as variáveis numéricas de acordo com a Expressão de E-caderina e β -catenina agrupados em negativo e positivo, o teste t de Student foi aplicado e, no caso onde não se observou distribuição normal dos dados, o teste não paramétrico U de Mann-Whitney foi adotado.

Para comparar variáveis categóricas de acordo com a expressão de E-caderina e β -catenina agrupados em negativo e positivo, o teste exato de Fisher foi adotado.

A associação entre as variáveis categóricas e as medidas de expressão E-caderina e β -catenina foi verificada através do teste não paramétrico U de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis quando a variável categórica apresentava três categorias.

Para verificar normalidade dos dados o teste de Shapiro-Wilk foi aplicado.

O tempo de seguimento foi o periodo entre a data de início de tratamento até a data do evento óbito ou a data da ultima informação para os casos sob censura (vivos ou perdidos de seguimento). Quanto ao período para recidivas, considerou-se da data final do tratamento até a data da ocorrência da recidiva.

A probabilidade de sobrevida global e livre de recidiva foi estimada por meio da curva de Kaplan-Meier e para verificar diferenças entre as curvas de sobrevida de cada variável o teste de logrank foi aplicado.

O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes estatísticos e o programa para computadores STATA versão 10.0 foi utilizado para a realização das análises estatísticas.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Foi analisado o material anatomopatológico de 52 pacientes com carcinoma de laringe por meio da confecção do TMA e posterior análise imunoistoquímica. Três pacientes foram excluídos por não se apresentar representatividade histológica após a coloração com hematoxilina e eosina. Outros quatro pacientes após perda de material quando da confecção do TMA.

A Tabela 1 descreve os dados clínicos dos indivíduos selecionados e as características clínico-patológicas bem como a separação dos grupos de estudo por sítio e progressão local sendo 15 casos em cada grupo. A idade média foi de 63 anos com 73,3% do gênero masculino, 66% de sítio glótico, 62,2% localmente avançados e 44,4% com metástase linfonodal presente.

Tabela 1. Distribuição da casuística de acordo com variáveis demográficas e clínicas (n = 45).

Variável	Categoria / Medidas	Freq. (%) / Medidas
Idade (anos)	Variação	47 - 79
	Mediana	62
	Média (desvio padrão)	63,0 (8,2)
Gênero	Masculino	33 (73,3)
	Feminino	12 (26,7)
Grupos de estudo	Tumor glótico avançado (1)	15 (33,3)
	Tumor supraglótico avançado(2)	15 (33,3)
	Tumor glótico precoce (3)	15 (33,3)
Sítio tumoral	Glótico	30 (66,6)
	Supraglótico	15 (33,3)
Estádio T	T1	12 (26,6)
	T2	5 (11,1)
	T3	16 (35,6)
	T4	12 (26,6)
Estádio T	T1 + T2	17 (37,8)
	T3 + T4	28 (62,2)
Estádio T + sítio tumoral glótico	Glótico e T1+T2	15 (50,0)
	Glótico e T3+T4	15 (50,0)
Estádio T + sitio tumoral supraglotico	Supraglótico e T1+T2	2 (13,3)
	Supraglótico e T3+T4	13 (86,7)
Estádio N	N0	25 (55,6)
	N+	20 (44,4)
Grau de diferenciação histológica	Bem	19 (42,2)
	Moderado	11 (24,4)
	Pouco	15 (33,3)
Tempo de seguimento (meses)	Variação	1 - 185
	Mediana	62
	Média (desvio padrão)	54,5 (40,1)
Óbito	Não	25 (55,6)
	Sim	20 (44,4)
Tempo para ocorrência de recidiva loco-regional	N	20
	Variação	3 - 33
	Mediana	9,0
	Média (desvio padrão)	10,2 (6,3)
Recidiva loco-regional	Não	25 (55,6)
	Sim	20 (44,4)

A distribuição da casuística de acordo com os marcadores analisados está descrita na Tabela 2. A média de frequência de expressão de E-caderina foi de 62,1% e 44,3% para β -catenina.

Tabela 2. Distribuição da casuística de acordo com: Expressão de E-caderina e β -catenina (n = 45).

Variável	Categoria / Medidas	Freq. (%) / Medidas
E-caderina	Variação	7,9 – 100,0
	Mediana	68,4
	Média	62,1
	Desvio padrão	33,6
Expressão E-caderina	≤ 68	22 (48,9)
Ponto de corte na mediana	> 68	23 (51,1)
β -catenina	Variação	0 – 100
	Mediana	51,0
	Média	44,3
	Desvio padrão	38,2
Expressão β -catenina	$\leq 50,0$	21 (46,7)
Ponto de corte na mediana	$> 50,0$	24 (53,3)
E-caderina (Membrana)	Negativo	3 (6,7)
	Positivo	42 (93,3)
β -catenina (Membrana)	Negativo	18 (40,0)
	Positivo	27 (60,0)
β -catenina (Citoplasma)	Negativo	44 (97,8)
	Positivo	1 (2,2)

A Tabela 3 mostra as associações entre as medidas das variáveis estudadas de acordo com expressão E-caderina. Observamos significância estatística na ocasião da queda de expressão de E-caderina em tumores glóticos avançados quando comparados a precoces, na ocorrência de metástase cervical e em tumores pouco diferenciados.

Tabela 3. Distribuição da casuística de acordo com a expressão de E-caderina.

Variável	Categoria	N	E-caderina (expressão)				p-valor
			variação	mediana	média	DP	
Faixa etária (anos)	≤ 62	23	11,2 – 100,0	81,5	66,2	33,8	0,339
	> 62	22	7,9 – 100,0	63,4	57,8	33,5	
Gênero	Feminino	12	15,3 – 100,0	52,0	58,9	35,6	0,979
	Masculino	33	7,9 – 100,0	72,1	63,3	33,3	
Sítio tumoral	Glótico	30	19,2 – 100,0	83,5	76,6	24,6	< 0,001
	Supraglótico	15	7,9 – 100,0	22,6	33,2	30,8	
Estádio T	T1 + T2	17	20,0 – 100,0	96,1	86,4	22,9	< 0,001
	T3 + T4	28	7,9 – 100,0	47,3	47,4	30,5	
Estádio T + sítio tumoral glótico	Glótico e T1+T2	15	20,0 – 100,0	96,1	87,1	23,4	0,004
	Glótico e T3+T4	15	19,2 – 100,0	68,4	66,2	21,6	
Estádio T+ sítio tumoral supraglótico	Supraglótico-T1+T2	2	63,0 – 100,0	81,5	81,5	26,2	0,051
	Supraglótico-T3+T4	13	7,9 – 100,0	19,1	25,8	24,5	
Estádio N	N0	25	19,2 – 100,0	89,2	77,0	26,9	0,001
	N+	20	7,9 – 100,0	33,9	43,6	32,3	
Grau de diferenciação histológica	Bem	19	20,0 – 100,0	96,1	87,8	21,2	< 0,001 *
	Moderado	11	22,6 – 100,0	63,0	57,5	26,9	
	Pouco	15	7,9 – 88,6	19,2	33,0	25,0	
E-caderina (membrana)	Negativo	3	20,0 – 83,2	41,0	48,1	32,2	0,438
	Positivo	42	7,9 – 100,0	70,2	63,1	33,8	
β-catenina (membrana)	Negativo	18	7,9 – 100,0	55,7	59,5	33,8	0,727
	Positivo	27	8,9 – 100,0	72,1	63,9	33,9	

p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney; * p-valor obtido pelo teste de Kruskal-Wallis; DP = desvio padrão.

Já a Tabela 4 representa a relação da β-catenina com a casuística selecionada. Notamos que baixos níveis de β-catenina estão associados a ocorrência de pior diferenciação tumoral e disseminação cervical.

Tabela 4. Distribuição da casuística de acordo com a expressão de β -catenina.

Variável	Categoria	N	β -catenina (expressão)				p-valor
			variação	mediana	média	DP	
Faixa etária (anos)	≤ 62	23	0,0 – 100,0	13,6	38,3	40,2	0,409
	> 62	22	0,0 – 100,0	56,7	50,5	35,9	
Gênero	Feminino	12	0,0 – 100,0	51,8	47,9	32,8	0,698
	Masculino	33	0,0 – 100,0	51,0	43,0	40,4	
Sítio Tumoral	Glótico	30	0,0 – 100,0	58,4	49,4	39,4	0,181
	Supraglótico	15	0,0 – 100,0	16,0	33,9	34,7	
Estádio T	T1 + T2	17	0,0 – 100,0	56,8	52,1	35,2	0,357
	T3 + T4	28	0,0 – 100,0	15,2	39,5	39,8	
Estádio T + sítio tumoral glótico	Glótico e T1+T2	15	0,0 – 100,0	56,8	50,2	36,8	0,850
	Glótico e T3+T4	15	0,0 – 100,0	67,6	48,7	43,2	
Estádio T+ sítio tumoral supraglótico	Supraglótico-T1+T2	2	50,4 – 81,8	66,1	66,1	22,2	0,170
	Supraglótico-T3+T4	13	0,0 – 100,0	11,7	29,0	34,1	
Estádio N	N0	25	0,0 – 100,0	65,3	56,3	36,3	0,027
	N+	20	0,0 – 100,0	12,6	29,3	36,0	
Grau de diferenciação histológica	Bem	19	0,0 – 100,0	60,0	53,1	37,5	0,004 *
	Moderado	11	0,0 – 100,0	69,7	68,8	31,1	
	Pouco	15	0,0 – 79,6	6,9	15,1	24,6	
E-caderina (membrana)	Negativo	3	0,0 – 7,7	0,0	2,61	4,4	0,081
	Positivo	18	0,0 – 100,0	50,7	45,8	40,9	
β -catenina (membrana)	Negativo	12	0,0 – 100,0	10,6	28,8	37,6	0,204
	Positivo	9	0,0 – 100,0	51,0	54,1	42,3	

p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney; * p-valor obtido pelo teste de Kruskal-Wallis; DP = desvio padrão.

A análise da relação entre o sítio tumoral em casos avançados e a expressão de E-caderina está descrita na Tabela 5. Observamos que tumores glóticos avançados apresentam maior expressão de E-caderina quanto comparado a tumores supraglóticos avançados e há diferença estatística nessa comparação.

Tabela 5. Relação entre o sítio tumoral com a expressão de E-caderina.

Variável	Categoria	N	E-caderina (expressão)				p-valor
			variação	mediana	média	DP	
Sítio Tumoral (T3+T4)	Glótico	15	19,2 – 100,0	68,4	66,2	21,6	< 0,001
	Supraglótico	13	7,9 – 100,0	19,1	25,8	24,5	

p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney; DP = desvio padrão.

Na Tabela 6, a relação entre o sítio tumoral com a β -catenina em que não observamos associação estatística quando comparado diferentes sítios em tumores avançados.

Tabela 6. Relação entre o sítio tumoral e a expressão de β -catenina.

Variável	Categoria	N	β -catenina (expressão)				p-valor
			variação	mediana	média	DP	
Sítio tumoral (T3+T4)	Glótico	15	0,0 – 100,0	67,6	48,7	43,2	0,199
	Supraglótico	13	0,0 – 100,0	11,7	29,0	34,1	

p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney; DP = desvio padrão.

Dados como a sobrevida global em 5 anos e a sobrevida livre de recidiva em 5 anos também foram avaliados em relação aos marcadores E-caderina e β -catenina e estão relacionados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. Observamos que, neste estudo, casos glóticos avançados apresentam menor sobrevida global e menor sobrevida livre de recidiva em 5 anos quando comparado a precoces assim como em situações de disseminação cervical e pouca diferenciação histológica, sendo estas relações estatisticamente significantes. Estabelecendo como ponto de corte do nível de expressão dos marcadores a mediana, temos que níveis acima deste ponto para E-caderina e β -catenina estão associados a melhor sobrevida livre de recidiva em 5 anos e para β -catenina melhor sobrevida livre de doença em 5 anos.

Tabela 7. Probabilidade de sobrevida global a 5 anos (n = 45).

Variável	Categoria	Probabilidade de sobrevida global a 5 anos (%)	p-valor
Sobrevida Global	(45 pacientes)	55,3	
Faixa etária (anos)	≤ 62	60,9	0,652
	> 62	50,0	
Gênero	Feminino	75,0	0,111
	Masculino	48,2	
Sítio Tumoral	Glótico	56,7	0,912
	Supraglótico	53,3	
Estádio T	T1 + T2	70,6	0,086
	T3 + T4	45,8	
Estádio T + sitio tumoral glótico	Glótico e T1+T2	73,3	0,049
	Glótico e T3+T4	40,0	
Estádio T + sítio tumoral supraglótico	Supraglótico e T1+T2	50,0	0,925
	Supraglótico e T3+T4	53,8	
Estádio N	N0	68,0	0,041
	N+	40,0	
Grau de diferenciação histológica	Bem	68,2	0,007
	Moderado	72,7	
	Pouco	26,7	
Expressão E-caderina	≤ 68	45,4	0,169
	> 68	64,8	
E-caderina (membrana)	Negativo	66,7	0,892
	Positivo	54,6	
Expressão β-catenina	≤ 50	33,3	0,002
	> 50	74,7	
β-catenina (membrana)	Negativo	44,4	0,108
	Positivo	62,6	

p-valor obtido pelo teste logrank

Tabela 8. Probabilidade de Sobrevida Livre de Recidiva 5-anos

Variável	Categoria	Probabilidade de sobrevida livre de recidiva a 5 anos (%)	p-valor
Sobrevida Global	(45 pacientes)	54,7	
Faixa etária (anos)	≤ 62	56,2	0,786
	> 62	53,0	
Gênero	Feminino	58,3	0,638
	Masculino	53,5	
Sítio Tumoral	Glótico	69,3	0,011
	Supraglótico	26,7	
Estádio T	T1 + T2	87,7	0,001
	T3 + T4	35,7	
Estádio T + sítio tumoral glótico	Glótico e T1+T2	92,9	0,006
	Glótico e T3+T4	46,7	
Estádio T + sítio tumoral supraglótico	Supraglótico e T1+T2		0,506
	Supraglótico e T3+T4	50,0 23,1	
Estádio N	N0	79,2	<0,001
	N+	25,0	
Grau de diferenciação histológica	Bem	78,0	<0,001
	Moderado	72,7	
	Pouco	13,3	
Expressão E-caderina	≤ 68	31,8	0,002
	> 68	77,5	
E-caderina (membrana)	Negativo	50,0	0,973
	Positivo	54,7	
Expressão β-catenina	≤ 50	36,0	0,005
	> 50	70,8	
β-catenina (membrana)	Negativo	47,2	0,402
	Positivo	59,3	

p-valor obtido pelo teste logrank.

O Gráfico 1 refere-se à probabilidade de sobrevida global por expressão de β -catenina utilizando a mediana como ponto de corte. Foi observada significância entre as curvas de sobrevida.

Gráfico 1. Probabilidade de sobrevida global por expressão β -catenina.

Os gráficos 2 e 3 representam, respectivamente, a probabilidade de sobrevida livre de recidiva por expressão E-caderina e β -catenina. A diferença entre as curvas de sobrevida para ambos marcadores traduz significado estatístico.

Gráfico 2. Probabilidade de sobrevida livre de recidiva por expressão E-caderina.

Gráfico 3. Probabilidade de Sobrevida Livre de Recidiva por expressão β -catenina.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A expressão de marcadores do complexo E-caderina-catenina em carcinomas laríngeos tem sido estudada por meio da análise imunoistoquímica⁷. A presença desse complexo é necessária para manter a adesão celular normal. Partindo desse princípio, estudos propuseram que a diminuição ou perda dessa molécula permite ou aumenta a chance de invasão do tecido celular adjacente a um carcinoma^{21,24}. A expressão anômala de E-caderina tem sido correlacionada com características patológicas do tumor, como estadiamento tumoral, grau de diferenciação, invasibilidade e envolvimento linfonodal².

A correlação entre o envolvimento linfonodal com a redução da expressão dos marcadores E-caderina e β -catenina têm sido estudada desde 1996, com resultados conflitantes.

Estudos publicados entre 1996 e 2015 revelam associação entre o CEC de laringe e a alteração na expressão de E-caderina, sendo frequente a redução de sua expressão em casos com metástase cervical^{20,31,36,37,38,40}, porém, houveram estudos contraditórios. Comparativamente, neste estudo, encontramos significância estatística quando avaliada a presença de metástase cervical em casos de expressão baixa de E-caderina afetando negativamente a sobrevida do paciente. Ao avaliar a expressão de β -catenina, Psyrris *et al.*⁴¹, em semelhança a este estudo, não encontraram significância estatística.

Dentre os estudos que avaliaram a relação da queda de expressão dos marcadores em questão com o sítio tumoral, apenas os estudos de Ahmed *et al.*⁴⁰ e de Goulioumiosis *et al.*³² encontraram significância ao observar menor expressão de E-caderina ($p=0,02$) e de β -catenina ($p=0,025$), respectivamente, no sítio

supraglótico. No presente estudo, foi demonstrado que tumores supraglóticos avançados apresentam menor expressão quantitativa de E-caderina quando comparados a tumores glóticos avançados ($p < 0,001$), diferentemente da expressão de β -catenina, em que não há essa associação.

Na avaliação da medida tumoral, os estudos revisados foram contraditórios, não havendo relação estatística com a expressão dos marcadores analisados. Neste estudo, em semelhança com a literatura, tanto nos casos glóticos como nos supraglóticos, não há significância entre tumores precoces e avançados quanto à variação de expressão de β -catenina. Quando avaliada a expressão quantitativa de E-caderina, observamos que, no sítio glótico, há significância, com $p = 0,004$. Nos casos supraglóticos, observamos que a queda de expressão em tumores avançados indica alguma associação, contudo, não significativa ($p = 0,051$).

Quando avaliado o grau de diferenciação histológica, há associação estatisticamente significativa e, pelo teste post hoc Dunn, tumores bem diferenciados apresentam medidas de E-caderina maiores que nos moderadamente diferenciados ($p = 0,007$) e também maior que pouco diferenciados ($p < 0,001$). Tumores moderadamente diferenciados apresentam medidas maiores que pouco diferenciados ($p = 0,031$). Na avaliação quantitativa de expressão de β -catenina, tumores bem diferenciados apresentam expressão maior que pouco diferenciados ($p = 0,005$) e casos moderadamente diferenciados maior que pouco diferenciados ($p = 0,001$) porém sem relação aos bem diferenciados ($p = 0,184$). Os resultados apresentados foram semelhantes ao encontrado na literatura revisada no qual há baixa diferenciação quando menor a expressão dos marcadores E-caderina^{20,29,34,38,40,41} e β -catenina³⁰.

Ao avaliar a sobrevida global e a sobrevida livre de doença, identificamos que tumores glóticos avançados, presença de metástase cervical e pouca diferenciação apresentam influência negativa no prognóstico e a redução da expressão de E-caderina está relacionada todos estes eventos, situação semelhante ao encontrado por Li *et al.*³⁶ e Ahmed *et al.*⁴⁰.

O grupo com ausência de linfonodos metastáticos apresentou maior sobrevida global (68%) e sobrevida livre de doença (79,2%) em relação aos casos com a presença da metástase linfonodal (40% e 25%, respectivamente), sendo esta uma associação com significância estatística ($p=0,041$ e $p<0,001$, respectivamente) e semelhante ao encontrado na literatura^{4,5}.

Greco *et al.*⁴⁵ encontraram correlação significativa entre o aumento de expressão de E-caderina com risco para pior sobrevida global. Esse dado foi controverso, visto que o aumento da expressão de E-caderina levaria à estabilização do complexo E-caderina/ β -catenina. No presente estudo, não encontramos significância nessa associação.

Utilizando ponto de corte na mediana, temos que expressão de β -catenina >50 apresenta maior sobrevida global (74,7%) do que β -catenina ≤ 50 com sobrevida em 5-anos de (33,3%) e essa diferença entre as curvas de sobrevida foi estatisticamente significativa ($p=0,002$), esta relação foi avaliada apenas pelo estudo de Greco *et al.*⁴⁵ onde não encontrou significância.

Com relação à sobrevida livre de doença, a expressão de E-caderina >68 , ponto de corte na mediana, apresentou a porcentagem de sobrevida livre de doença (77,5%) maior do que em quando ≤ 68 (31,8%) e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,002$). Ahmed *et al.*⁴⁰, Cappelleso *et al.*⁴³ e Li *et al.*⁴⁶ também encontraram relação positiva entre a sobrevida livre de doença e a alta

expressão de E-caderina. A expressão de β -catenina >50 apresenta maior sobrevida livre de doença (70,8%) do que β -catenina ≤ 50 (36,0%) e essa diferença entre as curvas de sobrevida foi estatisticamente significativa ($p=0,005$), em semelhança ao estudo de Greco *et al*⁴⁵.

Levando em consideração que a presença de metástase cervical é um importante fator de prognóstico desfavorável, casos em que há expressão anômala dos marcadores citados que, portanto, levariam a maior risco de metástase cervical, poderiam ser avaliados quanto a tratamento mais agressivo com associação a adjuvância e a manter seguimento com reavaliações em prazos curtos, especialmente aqueles em que não houve indicação de esvaziamento cervical prévio. Outro fator prognóstico como a progressão tumoral também foi verificada onde a perda de expressão de E-caderina pode representar casos localmente avançados no sítio glótico. Da mesma forma, casos de expressão preservada dos marcadores tenderiam a ter melhor diferenciação e, portanto, melhor prognóstico.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A expressão anômala dos marcadores E-caderina e β -catenina em pacientes com neoplasia maligna de laringe levam a impacto prognóstico ao relacionarem-se com a ocorrência de metástase cervical e também a maior agressividade local para E-caderina em tumores glóticos.

8. ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo A - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 024/15, em 18 de março de 2015.

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18/03/2015, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 024/15 intitulado: “O PAPEL DA VIA PROTÉICA WNT EM CARCINOMAS DE LARINGE” apresentado pelo Departamento de CIRURGIA.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Rogério Aparecido Dedivitis

Pesquisador (a) Executante: Carlos Eduardo Molinari Nardi

CEP-FMUSP, 18 de Março de 2015.

**Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa**

9. REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

1. Curado MP, Martins E. Incidência e mortalidade dos cânceres de cabeça e pescoço no Brasil. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço*. 2006;35:136-41.
2. Rodrigo JP, Dominquez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suarez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *Eur J Cancer*. 2002;38:1059-64.
3. Hirohashi S. Inactivation of the E cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*. 1998;153:333-9.
4. Snow GB, Annyas AA, van Slooten EA, Bartelink H, Hart AA. Prognostic factors of neck node metastasis. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1982;7(3):185-92
5. Shah JP. Cervical lymph node metastases. Diagnostic, therapeutic and prognostic implications. *Oncology (Williston Park)* 1990;4(10):61-9.
6. Mittari E, Charalabopoulos A, Batistatou A, Charalabopoulos K. The role of E-cadherin/catenin complex in laryngeal cancer. *Exp Oncol*. 2005;27:257-61.
7. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287(5785):795-801.
8. Jenny FH, Basler K. Powerful *Drosophila* screens that paved the wingless pathway. *Fly*. 2014;8(4):218-25.
9. Paul S, Dev A. Wnt signaling and cancer development: therapeutic implication. *Neoplasma*. 2008;55:165-76.
10. Wang H, Rajan S, Liu G, Chakrabarty S. Transforming growth factor beta suppresses beta-catenin/Wnt signaling and stimulates an adhesion response

- in human colon carcinoma cells in a Smad4/DPC4 independent manner. *Cancer Lett.* 2008;264:281-7.
11. Guo L, Zhong D, Lau S, Liu X, Dong XY, Sun X. Sox7 is an independent checkpoint for beta-catenin function in prostate and colon epithelial cells. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1421-30.
 12. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenic regulator. *Science.* 1991;251:1451-5.
 13. Kemler R. From cadherins to caderins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 1993;9:317-21.
 14. Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Nogushi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O. Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res.* 1989;49:2128-33.
 15. Ali S, Tiwari RM, Snow GB. False positive and false negative neck nodes. *Head Neck Surg.* 1985;8:78-82.
 16. Bowie GL, Caslin AW, Roland NJ, Field JKM, Jones AS, Kinsella AR. Expression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol.* 1993;18:196-201.
 17. Munck-Wikland E, Edstrom S, Jungmark E, Kuylesteerna R, Lindholm J, Auer G. Nuclear DNA content, proliferating-cell nuclear antigen (PCNA), and p53 immunostaining in predicting progression of laryngeal cancer in situ lesions. *Int J Cancer.* 1994;56:95-9.
 18. Tomasino RM, Daniele E, Bazan V, Morello V, Tralongo V, Nuara R, Nagar C, Salvato M, Ingria F, Restico S, Dardanoni G, Vecchione A, Russo A. Prognostic significance of cell kinetics in laryngeal squamous cell carcinoma: clinicopathological associations. *Cancer Res.* 1995;55:6103-8.

19. Shin DM, Voravud N, Ro JY, Lee JS, Hong WK, Hittelman WN. Sequential increases in proliferating cell nuclear antigen expression in head and neck tumorigenesis: a potential biomarker. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:971-8.
20. Franchi A, Gallo O, Boddi V, Santucci M. Prediction of occult metastasis in laryngeal carcinoma: role of proliferating cell nuclear antigen, MIB-1 and E-cadherin immunohistochemical determination. *Clin Cancer Res.* 1996;2:1801-8.
21. Takes RP, Baatenburg De Jong R, Keuning J, Hermans JO, Schuurin ED, Van Krieken HJ. Protein expression of cancer associated genes: biopsy material compared to resection material in laryngeal cancer. *Anticancer Res.* 1998;18:4787-92.
22. Mattijssen V, Peters HM, Shalkwijk L, Manni JJ, Hof-Grootenboer BV, De Mulder PHM, Rutter DJ. E-cadherin expression in head and neck squamous cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer.* 1993;55:580-5.
23. Nagafuchi A, Takeichi M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J.* 1988;7:3679-84.
24. Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of the head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res.* 1991;51:6328-37.
25. Field GK. Oncogenes and tumor-suppressor oncogenes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol Eur J Cancer.* 1992;28:67-76.
26. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 1999;1251:1451-5.

27. Birchmeier W. E-Cadherin as a tumor (invasion) suppressor gene. *Bioessays*. 1995;17:97-9.
28. Azarschab P, Stembalska A, Baus Longar M, Pfister M, Sasiadek M, Blin N. Epigenetic control of E-cadherin (CDH1) by CpG methylation in metastasing laryngeal cancer. *Oncol Rep*. 2003;10:501-3.
29. Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Remacle M. Expression of E-cadherin adhesion molecule in vocal cord carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 1997;254:417-21.
30. Lopez-Gonzalez JS, Cristerna-Sanchez L, Vazquez-Manriquez ME, Jimenez-Orci G, Aguilar-Cazares D. Localization and level of expression of β -catenin in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;130:89-93.
31. Rodrigo JP, Dominguez F, Suarez V, Canel M, Secades P, Chiara MD. Focal adhesion kinase and E-Cadherin as markers for nodal metastasis in laryngeal câncer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007;133:145-50.
32. Goulioumis AK, Varakis J, Goumas P, Papadaki H. Differential β -catenin expression between glottic and supraglottic laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2010;267:1573-8.
33. Paksoy M, Hardal U, Caglar C. Expression of cathepsin D and E-cadherin in primary laryngeal cancers correlation with neck lymph node involvement. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137:1371-7.
34. Carico E, Radici M, Losito NS, Raffa S, Firrisi L, Fabiano A, Manola M, Vecchione A, Giovagnoli MR. Expression of E-cadherin and α -catenin in T1N0 laryngeal cancer. *Anticancer Research*. 2012;32:5245-50.

35. Galera-Ruiz H, Ríos-Moreno MJ, González-Cámpora R, Ortega I, Fernández A, García-Escudero A, Galera-Davidson H. The cadherin–catenin complex in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012;269:1183-8.
36. Li J, Zhang G, Yang X, Li S, Liu X, Yang Q, Li Y, Ye J. Reduced E-cadherin expression is associated with lymph node metastases in laryngeal squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2012;39:186-92.
37. Zvrko E, Mikić A, Jancic S. Relationship of E-cadherin with cervical lymph node metastasis in laryngeal cancer. *Coll. Antropol.* 2012;36:119-24.
38. Akdeniz O, Akduman D, Haksever M, Ozkarakas H, Müezzinoğlu G. Relationships between clinical behavior of laryngeal squamous cell carcinomas and expression of VEGF, MMP-9 and E-cadherin. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14:5301-10.
39. Starska K, Forma E, Lewy-Trenda I, Papież P, Woś J, Bryś M. Diagnostic impact of promoter methylation and E-cadherin gene and protein expression levels in laryngeal carcinoma. *Współczesna Onkol.* 2013;17(3):263-71.
40. Ahmed RA, Shawky AE, Hamed RH. Prognostic significance of cyclin D1 and E-cadherin expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2014;20:625-33.
41. Psyrris A, Kotoula V, Fountzilas E, Alexopoulou Z, Bobos M, Televantou D, Karayannopoulou G, Krikelis D, Markou K, Karasmanis I, Angouridakis N, Kalogeras K, Nikolaou A, Fountzilas G. Prognostic significance of the Wnt pathway in squamous cell laryngeal cancer. *Oral Oncology.* 2014;50:298-305.
42. Rodrigo JP, Martínez P, Allonca E, Alonso-Durán L, Suárez C, Astudillo A, García-Pedrero JM. Immunohistochemical markers of distant metastasis in

laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas. Clin Exp Metastasis. 2014;31:317-25.

43. Cappellesso R, Marioni G, Crescenzi M, Giacomelli L, Guzzardo V, Mussato A, Staffieri A, Martini A, Blandamura S, Fassina A. The prognostic role of the epithelial–mesenchymal transition markers E-cadherin and Slug in laryngeal squamous cell carcinoma. Histopathology. 2015;67:491-500.
44. Bayram A, Yüce I, Çağlı S, Canöz Ö, Güney E. Predictive value of E-cadherin and Ep-CAM in cervical lymph node metastasis of supraglottic larynx carcinoma. Am J Otolaryngol. 2015;36(6):736-40.
45. Greco A, Virgilio A, Rizzo MI, Pandolfi F, Rosati D, Vincentiis M. The prognostic role of E-cadherin and b-catenin overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. Laryngoscope. 2016;126:E148-55.

10. APÊNDICE

10. APÊNDICE

Apêndice A – Banco de dados

Caso	Grupo	Idade	Gênero	Grau Histológico	T	N	Recidiva LR	Sob Global	Status	E-caderina	β-catenina
							meses	meses		% expressão	% expressão
21	1	74	M	pouco diferenciado	T3	N0	6	10	óbito por câncer	34	0
25	1	48	M	pouco diferenciado	T4a	N0	4	8	óbito por câncer	19,2	11,9
26	1	58	M	moderadamente diferenciado	T3	N+	não ocorreu	69	vivo sem doença	56,7	0
27	1	51	F	moderadamente diferenciado	T3	N+	9	12	óbito por câncer	100	100
30	1	53	M	bem diferenciado	T4a	N+	8	12	óbito por câncer	83,8	0
31	1	47	F	pouco diferenciado	T3	N+	não ocorreu	185	vivo sem doença	88,6	13,5
32	1	71	M	bem diferenciado	T3	N+	3	13	óbito por câncer	79,3	73,5
63	1	74	M	moderadamente diferenciado	T3	N0	não ocorreu	70	vivo sem doença	75	69,7
64	1	67	M	pouco diferenciado	T4	N+	8	23	óbito por câncer	54,7	0
65	1	58	M	pouco diferenciado	T4	N+	11	18	óbito por câncer	53,8	14,4
66	1	78	M	moderadamente diferenciado	T3	N0	não ocorreu	49	óbito por outras causas	68,4	100
67	1	56	M	moderadamente diferenciado	T3	N0	não ocorreu	63	vivo sem doença	72,1	100
68	1	70	M	pouco diferenciado	T3	N0	não ocorreu	75	vivo sem doença	63,8	67,6
69	1	64	M	pouco diferenciado	T4	N+	13	24	óbito por outras causas	53,7	79,6
70	1	69	M	moderadamente diferenciado	T3	N0	não ocorreu	78	vivo sem doença	89,2	100
33	2	62	F	moderadamente diferenciado	T3	N0	33	93	vivo sem doença	34	72,1
36	2	52	F	bem diferenciado	T2	N0	não ocorreu	185	vivo sem doença	100	81,8
38	2	64	F	moderadamente diferenciado	T1	N0	10	30	óbito por outras causas	63	50,4
39	2	51	M	bem diferenciado	T4	N+	15	40	perdido seguimento	100	100
41	2	61	F	pouco diferenciado	T3	N+	12	45	perdido seguimento	41	0
53	2	66	M	pouco diferenciado	T3	N+	12	73	vivo sem doença	10,4	16
54	2	59	M	pouco diferenciado	T4	N+	9	15	óbito por câncer	13,1	0
55	2	64	M	pouco diferenciado	T3	N+	10	18	óbito por câncer	7,9	0
56	2	68	F	moderadamente diferenciado	T3	N+	não ocorreu	79	vivo sem doença	22,6	53,2
57	2	70	F	pouco diferenciado	T4	N+	7	32	óbito por câncer	15,3	11,7
58	2	57	M	pouco diferenciado	T4	N+	6	19	óbito por câncer	11,2	6,9
59	2	73	M	moderadamente diferenciado	T4	N+	não ocorreu	96	vivo sem doença	24,8	64,1
60	2	61	M	pouco diferenciado	T4	N+	5	12	óbito por câncer	19,1	0
61	2	75	M	pouco diferenciado	T4	N+	8	26	óbito por câncer	8,9	5,2
62	2	63	F	moderadamente diferenciado	T3	N+	não ocorreu	64	vivo sem doença	26,9	47,6
43	3	57	M	bem diferenciado	T1a	N0	não ocorreu	25	óbito por outras causas	96,4	0
44	3	74	M	bem diferenciado	T1a	N0	não ocorreu	76	vivo sem doença	100	56,6
45	3	57	M	bem diferenciado	T1b	N0	não ocorreu	75	vivo sem doença	81,5	51
47	3	60	M	bem diferenciado	T1b	N0	não ocorreu	27	óbito por outras causas	94,7	0
48	3	73	M	bem diferenciado	T1a	N0	não ocorreu	1	óbito por outras causas	83,2	0
49	3	53	M	bem diferenciado	T2	N0	não ocorreu	68	vivo sem doença	44,8	13,6
50	3	70	M	bem diferenciado	T1a	N0	15	62	vivo sem doença	100	100
51	3	62	F	bem diferenciado	T1b	N0	não ocorreu	67	vivo sem doença	20	7,7
52	3	79	M	bem diferenciado	T1a	N0	não ocorreu	40	óbito por outras causas	100	100
71	3	54	M	bem diferenciado	T2	N0	não ocorreu	80	vivo sem doença	99,2	86,9
72	3	62	F	bem diferenciado	T1	N0	não ocorreu	76	vivo sem doença	100	76,4
73	3	59	M	bem diferenciado	T2	N0	não ocorreu	68	vivo sem doença	94,7	65,3
74	3	67	M	bem diferenciado	T2	N0	não ocorreu	77	vivo sem doença	96,1	56,8
75	3	68	F	bem diferenciado	T1	N0	não ocorreu	82	vivo sem doença	95,3	60
76	3	57	M	bem diferenciado	T1	N0	não ocorreu	94	vivo sem doença	100	78,9