



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

BRUNA FERNANDES DO CARMO CARVALHO

**SUPEREXPRESSÃO DE GENES DA VIA WNT/B-CATENINA
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL**

2020

BRUNA FERNANDES DO CARMO CARVALHO

**SUPEREXPRESSÃO DE GENES DA VIA WNT/ β -CATENINA
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Diagnóstico em patologia.

Orientadora: Profa. Tit. Janete Dias Almeida

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Ghislaine Oliveira Alves

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Carvalho, Bruna Fernandes Do Carmo

Superexpressão de genes da via Wnt/b-catenina no carcinoma de células escamosas bucal / Bruna Fernandes Do Carmo Carvalho. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Aplicada à Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientador: Janete Dias Almeida

Coorientador: Mônica Ghislaine Oliveira Alves

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Expressão gênica. 3. Mucosa bucal . 4. Tabagismo. 5. Via de sinalização Wnt. I. Almeida, Janete Dias, orient. II. Alves, Mônica Ghislaine Oliveira, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Janete Dias Almeida (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Tit. Fábio Daumas Nunes

Universidade de São Paulo (USP)

Faculdade de Odontologia

Campus de São Paulo

Prof. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 14 de Fevereiro de 2020.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Hugo, por acreditar tanto (se não mais) nos meus sonhos, quanto eu acredito. À pessoa que deseja me ver alçar voos cada vez mais altos e, que se assim pudesse, me daria asas. Para a pessoa que realmente não mede esforços para que meus dias e minha caminhada se tornem melhores. Para aquele que me mostrou que *“amor é pensar primeiro no que faz sua outra metade feliz, no que a completa. É abdicar de algumas coisas sem pensar, é ver o brilho no olhar dela e sentir que aquela realização é sua também”*. Tenha certeza que todas as minhas conquistas também são suas e tem muito do seu esforço. Nada seria possível sem seu apoio, compreensão e paciência. Obrigada pelo amor e companheirismo incondicionais.

À minha tia-avó Maria (*in memorian*), pelo exemplo de caráter, força e fé. Hoje, seguimos separadas fisicamente, mas sei (e sinto) que você segue iluminando e abençoando meus passos. Não existe um só dia em que eu não me lembre de você e não me sinta imensamente honrada, por ter sido escolhida e acolhida como uma “filha”. Seus ensinamentos ainda ecoam me fazendo andar pelos caminhos retos, me lembrando de quem eu sou e, principalmente, me fazendo explorar até onde posso chegar. Espero que esteja orgulhosa da pessoa que me tornei. Que algum dia eu tenha a felicidade de ser luz como você foi. Saudades eternas!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Profa. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira e do vice-coordenador Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado no período de janeiro/2018 a dezembro/2019.

Aos meus pais, Carlos e Elenice, que me ensinaram a importância da responsabilidade e do compromisso. Por me incentivarem desde cedo, mesmo que sem intenção, a fazer minhas próprias escolhas, a fortalecer minha personalidade, a ser independente e ir em busca dos meus objetivos.

À minha querida orientadora, Profa. Adj. Janete Dias Almeida, que me recebeu de volta, amorosamente e de braços abertos, na UNESP e na “Família Almeida”. Pessoa que nestes anos de convivência, concedeu-me a oportunidade de aprender, desabrochar e também ensinar. Para essa “mãe do coração”, um tanto “Poliana”, que tanto nos ensina sobre Estomatologia e, acima de tudo, sobre a vida. Minha gratidão não se faz somente pelos conhecimentos transmitidos ou pelas oportunidades ofertadas, mas pela amizade sincera, pelo carinho constante e pelas conversas (comemorações e cafés da tarde) que tanto me acrescentam pessoal e profissionalmente.

À minha mais que co-orientadora, Profa. Dra Mônica Ghislaine Oliveira Alves, pessoa sem a qual eu não teria realizado este e outros tantos projetos. Para pessoa que é meu exemplo de leveza, determinação e competência. Há tempos nossa amizade rompeu a “barreira científica” e me sinto extremamente sortuda, feliz e grata por isso. Obrigada pelos incentivos constantes!

Aos professores da banca, Profa. Assoc. Luana Luana Marotta Reis de Vasconcellos e Prof. Tit. Fábio Daumas Nunes, que tão gentilmente aceitaram participar deste momento especial e, dividiram comigo suas experiências fazendo contribuições importantíssimas para lapidação deste trabalho.

Às professoras, Profa. Assoc. Estela Kaminagakura Tango e Profa. Assoc. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante por cada conhecimento transmitido. A vocês que me deram a oportunidade de “estrear” como professora, que me acolheram, confiaram em mim e dividiram comigo, a disciplina que tanto amo. Foi um privilégio! Obrigada por acreditarem em mim e me ajudarem a florescer!

À Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder, por ser exemplo e inspiração de dedicação ao ensino e à pesquisa. Por me mostrar que pensar diferente não significa pensar errado e ainda, que devemos acreditar em nosso potencial, haja o que houver. Obrigada pela parceria, pelos conselhos, pelo carinho e por ter estado sempre à disposição quando precisei.

Ao Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves e Dr. José Divaldo Prado, que mesmo após meu período de residência no AC Camargo, mantiveram as portas abertas e, cederam seus casos clínicos, para que eu ilustrasse minhas aulas. Minha sincera gratidão, principalmente, por se fazerem presentes em um momento muito delicado da minha vida. Obrigada por todo apoio, carinho e amizade!

À Profa. Dra Patrícia Pimentel de Barros, que em meio a muito afazeres, dedicou um pouco do seu tempo para me ajudar com os experimentos da PCR. Obrigada pela disponibilidade e por me inspirar a ser uma pesquisadora melhor.

A todos os alunos (que agora já posso chamar de meus) para os quais tive o prazer de ministrar aulas. Meus agradecimentos para as Turmas 18 e 19 do Noturno e Turmas 63 do Integral, que me instigaram a ser, a cada dia, uma professora (e pessoa) melhor. Obrigada pelos desafios e pela acolhida amorosa!

Em especial, gostaria de agradecer a Turma 62 do Integral. A vocês que fizeram meu dia 09 de setembro de 2019, entrar pra classe dos “dias mais especiais da minha vida”. Dia que passou a pertencer ao meu calendário pessoal e oficial de comemorações! Vocês me deram o maior presente e honraria que um professor pode ter, que é ser o tão “batucado” e esperado PROFESSOR HOMENAGEADO. E não digo isso pelo “título” em si, mas sim pelo significado. Neste dia, dentre vários professores, vocês me escolheram para fazer parte da vida de vocês. Assim, eu rio, às vezes choro e arrepio só de me lembrar. Sigo, atordoada, sem entender como isso tudo aconteceu.

Lembro-me que falei, chorosamente, que eu seria para sempre “madrinha de vocês”, mas na verdade eu cometi um grave engano. Vocês foram minha primeira turma, o que os torna oficialmente meus padrinhos e madrinhas de docência. Queridos, vocês estiveram sempre ao meu lado, até nos momentos difíceis. Vocês oram por mim, mandaram mensagens e energias positivas e, isso se chama "ser a coisa boa do dia de alguém" (e vocês aprenderam direitinho). Vocês foram, são e sempre serão, a minha “coisa boa”, a coisa boa do meu dia! Vocês me encheram de esperança, me mostraram que eu estava no caminho certo e isso, não tem preço! Espero que daqui há alguns anos, vocês ainda se orgulhem dessa pessoa que vos escreve.

Às minhas alunas de iniciação científica, Giovana Gueri e Júlia Pieroni. Estas meninas que sempre foram extremamente amáveis e pacientes comigo, ainda que nossos horários fossem corridos e nossos prazos bem apertados. Vocês foram minhas primeiras “orientadas”, me ensinaram muito e lembrarei de vocês com muito carinho. Obrigada por confiarem tanto em mim e por me escolherem para dividir esta fase tão importante da vida de vocês!

À minha “irmã-científica-caçula”, mais conhecida como nosso "raio de sol", Camila Panisello. À pessoa mais doce, meiga e de coração generoso, que conheci nesses últimos anos. Pessoa que rompeu a barreira laboratorial e passou a ser minha conselheira, amiga e confidente. Em nosso tempo de convivência, além do nosso amor pela Estomatologia, dividimos muitos momentos e sei, que você me ensinou muito mais do que aprendeu. Você me inspirou a ser uma pessoa melhor. E espero que você continue iluminando a tudo e todos, por onde passar. Irmã, obrigada por ser “minha irmã”. Você é brilhante (e é meu orgulho)!

Aos amigos da pós-graduação, Anderson, Cheyenne, Elis, Hanna, Jaqueline, Maíra, Noala e Victor. Obrigada pelos momentos de trabalho e companheirismo, mas principalmente pelos cafés e momentos descontração, que tornaram minha caminhada mais leve e animada.

Agradeço em especial à minha querida amiga, Renata Mendonça Moraes, companheira de pós-graduação e fiel escudeira, que mesmo não fazendo parte do mesmo grupo de pesquisa e, sem ganhar nada em troca, me auxiliou por vezes a desenvolver as etapas deste projeto. Fosse direta ou indiretamente, técnica ou emocionalmente, você sempre esteve lá. Para esta irmã que a vida gentilmente me deu, comadre, maior incentivadora, conselheira, companheira de

viagens e tantos outros chamamentos carinhosos que lhe cabem. Amiga, obrigada por vibrar tanto com as minhas conquistas. Que possamos brilhar juntas, que a vida nos possibilite compartilhar infinitos momentos felizes e, que eu possa sempre retribuir esse carinho que me é ofertado!

À Lígia Tavares, pela qual tenho um carinho especial e admiro muito pela educação e gentileza que lhe são peculiares. Neste tempo de convívio sempre estive disposta a partilhar boas conversas, me dar bons conselhos e se tornou um dos meus exemplos de fé em Deus.

Às minhas “irmãs” da família Almeida, Keila, Mariana e Nayara, com as quais dividi muitas conquistas, discussão de ideias e confidências. Cada uma de vocês, com seu jeito peculiar, me acrescentou coisas importantes. A Keila me ensinou a ser mais focada, disciplinada e determinada. Ensinou-me a falar menos e fazer mais! A Mari me ensinou a ser mais delicada, amorosa e paciente. Ensinou-me a agradecer mais e esbravejar menos. Mas agradeço em especial a Nayara, pela qual nutro carinho especial e com a qual, aprendi o quão enriquecedoras podem ser as novas amizades, compostas por pessoas tão diferentes. Você me ensinou muitas coisas, sem nunca deixar de ser generosa e carinhosa. Com você aprendi a ouvir e aconselhar mais. Obrigada pela amizade sincera, por cada palavra de incentivo, por cada torcida, cada piada, cada post-it, cada gargalhada, cada confidência e cada “abraço forçado”!

À amiga querida e dupla unespiana, Ellen Eduarda Fernandes. Sou extremamente grata por essa amizade que se iniciou na graduação e se mantém forte até os dias hoje. Para esta pessoa amável e divertida, que jamais negou seu ombro amigo, suas palavras de conforto, sua acolhida fraternal, almoços ou cafés da tarde. Obrigada pelo amor a amizade!

Aos meus amigos Carolina Costa, Larissa Leandro, Fábio Marcelino, Rafael Pazzini, Ariane Souza e Erik Sales, os quais me ampararam nos momentos mais difíceis da minha vida, mostrando-me o tamanho de seu amor. A minha mais sincera e eterna gratidão a estas pessoas que são minha família, ainda que não tenhamos o mesmo sobrenome.

Aos funcionários do ICT-UNESP, que me ajudaram, direta ou indiretamente neste trabalho e também me auxiliaram a superar os obstáculos encontrados. Em especial ao técnico da Propedêutica Estomatológica, Sérgio Giovanny Alves, às técnicas de laboratório, Ana Lourdes e Maria Salete e à Assessora do Departamento, Carla Tavares.

Aos pacientes, que de forma tão generosa depositaram sua confiança e respeito na equipe da qual faço parte. Minha gratidão pelo carinho, pela paciência e por nos ensinarem tanto sobre a vida.

Finalmente, a Deus, o Senhor da minha vida. A quem tanto roguei para que as nossas vontades coincidissem e, que se por ventura não coincidissem, que a Dele prevalecesse. Ao Senhor que me sustenta e coloca seus “anjos terrenos” para cuidarem de mim. Aquele que me capacita para ser e fazer tudo o que eu quiser. Que me envia muitos desafios, me concede muitos milagres e como uma brisa suave, mostra diariamente que cuida e ilumina os meus passos. A Ele que jamais fechou uma porta em minha vida sem que outras tantas (e melhores) estivessem abertas.

“Dificuldades preparam pessoas comuns, para destinos extraordinários.”

C.S Lewis

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Comitê de ética	24
3.2 Seleção das amostras	24
3.3 Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão	25
3.4 Avaliação do grau de dependência de nicotina e perfil tabágico	25
3.5 Avaliação do perfil etílico.....	27
3.6 Extração de RNA	27
3.7 Transcrição reversa	28
3.8 Escolha dos primers.....	29
3.9 Análise da expressão gênica.....	30
3.9.1 Escolha do gene endógeno.....	30
3.9.2 Análise da curva padrão	31
3.9.3 PCR quantitativa em tempo real	34
3.10 Análise estatística	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Caracterização dos grupos.....	36
4.1.1 Grupo Carcinoma (GCA).....	37
4.1.2 Grupo Controle (GCO).....	39
4.2 Perfil tabágico e etílico	39

4.3 Expressão gênica	40
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS*	53
APÊNDICE	61
ANEXO	63

Carvalho BFC. Superexpressão de genes da via Wnt/ β -catenina no carcinoma de células escamosas bucal [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, 2020.

RESUMO

O presente trabalho tem como proposição avaliar a expressão de genes da via de sinalização Wnt no carcinoma de células escamosas bucal (CCE). Foram avaliados dois grupos: Grupo controle (GCO): 12 amostras de mucosa bucal com aspecto de normalidade. Grupo carcinoma (GCA): 30 amostras com diagnóstico histopatológico de CCE. As informações quanto ao hábito tabágico, consumo de etílicos, gradação e estágio da doença foram extraídas dos prontuários. A expressão dos genes *WNT5A*, *APC*, *CTNNB1*, *CCND1*, *MYC* foi avaliada por meio de RT-qPCR e, os resultados de expressão gênica foram correlacionados com os dados clinicopatológicos dos pacientes. Os dados foram analisados por meio do *software GraphPad Prism 5.03*. Utilizou-se o teste t de *Student* e os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman, com nível de significância de 5% para todos os testes. Houve superexpressão dos genes, *WNT5A* (*fold increase*=0,28; *p*=0,034), *APC* (*fold increase*=0,74; *p*=0,043), *CTNNB1* (*fold increase*=0,36; *p*=0,493), *CCND1* (*fold increase*=0,67; *p*=0,049) e *MYC* (*fold increase*=0,99; *p*=0,001) no GCA, quando comparado ao GCO. Ainda, a expressão do gene *MYC* apresentou correlação inversamente proporcional com o consumo de cigarros por dia (-3,76; *p*=0,040) e carga tabágica (-3,73; *p*=0,043). Já a expressão do gene *CTNNB1* apresentou correlação inversamente proporcional ao Teste de Fagerström (-0,405; *p*=0,026) e a gradação histopatológica (-0,419; *p*=0,021). A via de sinalização Wnt/ β -catenina mostrou-se envolvida na carcinogênese bucal das amostras estudadas, por meio da superexpressão dos genes *WNT5A*, *APC*, *CCND1* e *MYC*. Interessantemente, o aumento da expressão de *CTNNB1* correlacionou-se com menor carga tabágica da mesma forma que o *MYC* com menor número de cigarros diários e menor carga tabágica. Assim, sugere-se que o papel da via Wnt parece ser importante nos estágios iniciais da carcinogênese bucal e que a ativação ou superexpressão dos genes se dá de maneira independente ao hábito tabágico.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas. Expressão gênica. Mucosa bucal. Tabagismo. Via de sinalização Wnt.

Carvalho BFC. Overexpression of Wnt/ β -catenin pathway genes in oral squamous cell carcinoma [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

This study aim was to investigate the Wnt signaling genes expression in oral squamous cell carcinoma (SCC). Patients were divided into 2 groups: Control group (COG): 12 samples of oral mucosa with normal appearance. Carcinoma group (CAG): 30 samples of histopathological SCC diagnosis. Smoking habits, alcohol consumption, disease histopathological grade and clinical staging were accessed from medical records. The expression of the WNT5A, APC, CTNNB1, CCND1 and MYC genes was evaluated by RT-qPCR and the gene expression profile were correlated with the clinicopathological data of the patients. The groups were compared by the Student t-test, with $p < 0.05$ indicating a significant difference. The gene expression results were correlated with clinical data with Pearson's and Sperman's correlation coefficient. It was seen an overexpression of WNT5A (fold increase=0,28; $p=0,034$), APC (fold increase=0,74; $p=0,043$), CTNNB1 (fold increase=0,36; $p=0,493$), CCND1 (fold increase=0,67; $p= 0,049$) e MYC (fold increase=0,99; $p=0,001$) compared to COG. The Wnt / β -catenin signaling pathway was shown to be involved in the oral carcinogenesis of the studied samples, through the overexpression of the WNT5A, APC, CCND1 and MYC genes. Interestingly, the increased expression of CTNNB1 was correlated to a lower load in the same way as MYC was correlated to a lower number of daily cigarettes and a lower smoking load. Thus, it is suggested that the role of the Wnt pathway appears to be important in the early stages of oral carcinogenesis and that the activation or overexpression of genes occurs independently of smoking.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Gene expression. Mouth mucosa. Tobacco use disorder. Wnt signaling pathway.

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reforça que cerca de 30% a 50% dos casos de câncer em todo o mundo podem ser evitados, uma vez que se reduza a exposição aos fatores de risco. Dentre os principais fatores evitáveis para adoecimento e morte, chama-se atenção para o tabagismo, pois as doenças tabaco-relacionadas, incluindo o câncer, são responsáveis por aproximadamente 6 milhões de mortes por ano (WHO, 2011, 2015). Nos países em desenvolvimento, aponta-se aumento deste número para 10 milhões de mortes, para o ano de 2020 (Warnakulasuriya et al., 2005).

O tabaco é considerado um agente iniciador e promotor no processo da carcinogênese, sendo que os carcinógenos presentes em sua composição podem atuar em diferentes fases do referido processo (Scully et al., 2000; Winn, 2001). Sabe-se ainda, que apesar da ausência de lesões ou alterações clínicas evidentes, os fumantes apresentam uma maior atividade na proliferação celular bem como, aumento de alterações inflamatórias e queratinização (Fontes et al., 2008; Pavanello et al., 2006;).

Assim sendo, reforça-se o tabagismo como fator de risco a ser considerado para muitos tipos de câncer, entre eles câncer de boca, esôfago, laringe, pulmão, rim, bexiga, pâncreas, estômago e colo do útero (INCA, 2018). No Brasil, para cada ano do biênio 2018-2019, com relação ao câncer de boca, estimou-se 11.200 casos novos em homens e 3.500 em mulheres, tornando-se a quinta neoplasia maligna mais prevalente em homens e a décima segunda em mulheres (INCA, 2018).

Dentre as neoplasias malignas bucais, o carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo histológico mais prevalente, compreendendo cerca de 90% dos casos (WHO, 2015). Esta neoplasia maligna tem sua origem no epitélio

pavimentoso estratificado e sua apresentação clínica pode variar desde eritroleucoplasias, úlceras associadas a eritroleucoplasias ou úlceras isoladas (Pires et al., 2013; Venturi et al., 2004).

O CCE apresenta maior prevalência em adultos do sexo masculino, com faixa etária média de 50 anos de idade, enquanto as mulheres são afetadas uma década mais tarde. As áreas de maior incidência são a borda lateral de língua, assoalho bucal e gengiva, sendo a borda posterior da língua a localização mais frequente (Lambert et al., 2011; Pires et al., 2013).

O processo de carcinogênese é multifatorial e se desenvolve a partir de diversas alterações genéticas e epigenéticas que podem sofrer influência de fatores ambientais ou hereditários (Califano et al., 1996). Estas alterações promovem mudanças que culminam na superexpressão genes conhecidos como oncogenes, relacionados à ativação do ciclo celular e, na supressão de genes chamados supressores de tumor, responsáveis pela parada do ciclo celular e checagem quanto a alterações no DNA, ativando quando necessário vias de reparo de DNA e apoptose/senescência (Leemans et al., 2011). Sendo assim, estas alterações podem promover tanto modificações nos mecanismos de metabolização dos carcinógenos, quanto no reparo do DNA ou ainda, no controle do crescimento celular (Scully, 2011).

Alguns genes e proteínas, principalmente os componentes das vias relacionadas ao reparo do DNA, já foram observados e apontados como importantes e superexpressos no indivíduo tabagista assim como, relevantes no processo da carcinogênese oral (Alves et al., 2017; Bau et al., 2010). Entretanto, novas vias de sinalização têm sido estudadas, pois embora já se saiba quanto a alguns fatores de risco, o câncer, de uma maneira geral, resulta de um processo multifatorial e necessita de um melhor entendimento, bem como novas possibilidades de tratamento, principalmente para os casos que não responde às terapias convencionais (Leemans et al., 2018; Zeng et al., 2018).

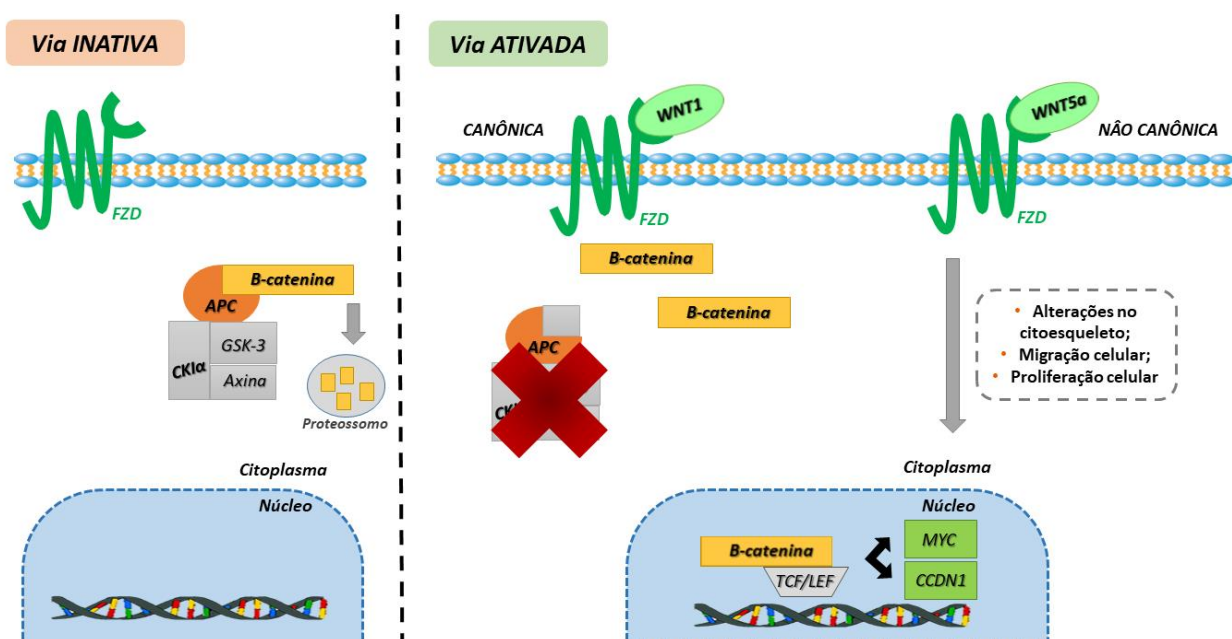
A via de sinalização Wnt apresenta uma importante função durante o processo de desenvolvimento embrionário dos vertebrados, como, na regulação da homeostase, proliferação, diferenciação, migração e morte celular (Kikuchi et al., 2011). Na espécie humana, 19 glicoproteínas da família Wnt foram identificadas e, podem ser subdivididas de acordo com a sua capacidade de ativação das seguintes vias de sinalização intracelular: a) as glicoproteínas Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a e Wnt10, são capazes de ativar a via canônica ou também conhecida como via β -catenina-dependente; b) as glicoproteínas Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b e Wnt11, são capazes de ativar a via Wnt/ Ca^{2+} , a qual é associada à proliferação celular e à apoptose; c) as glicoproteínas Wnt5a e Wnt11 ativam a via da polaridade celular planar (PCP), que está associada à organização do citoesqueleto (Liu, Millar, 2010; Niehrs, 2012).

Em células adultas normais, na ausência de estímulo, a proteína β -catenina é ubiquitinada e degradada através de proteossomas. Este processo se dá por meio de um complexo de destruição intracitoplasmático formado pelas proteínas: axina, *adenomatous polyposis coli* (APC), proteína quinase glicogênio sintase 3 β (GSK3 β) e a caseína quinase 1 α (CK1 α). A proteína APC é responsável por se ligar à proteína β -catenina, que circula livre no citoplasma, e por conduzi-la para a formação do complexo com as demais proteínas, conforme ilustrado na figura 1 (Kikuchi et al., 2011; Niehrs, 2012; Polakis, 2000).

A via canônica, que se encontra mais comumente em sua forma inativa, passa a ser ativada após a interação entre as glicoproteínas Wnt com o receptor de superfície celular *frizzled* (FZ) e o seu co-receptor, o receptor de lipoproteína de baixa densidade 5 ou 6 (LRP5/6). Este processo culmina na ativação e fosforilação da proteína sinalizadora citoplasmática *dishelleved* (DSH), que por sua vez irá promover a dissociação e inativação do complexo de degradação da β -catenina. Logo, não sendo mais degradada, a β -catenina acumula-se no

citoplasma, podendo assim, migrar para o núcleo celular, onde se ligará ao *T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer binding factor 1* (TCF/LEF) e exercerá sua função de ativadora transcricional dos genes alvo da via. Nas vias não canônicas, PCP e Wnt/Ca²⁺, as glicoproteínas Wnt promovem a ativação independentemente da β -catenina, desencadeando a transcrição dos genes alvo (Figura 1) (Hurlstone et al., 2002; Kikuchi et al., 2011; Niehrs, 2012; Polakis, 2000).

Figura 1- Funcionamento da via de sinalização Wnt. Ativação da via canônica e não canônica



Fonte: Elaborada pela autora, adaptada de Kikuchi et al., 2011.

A sinalização aberrante ou perturbações no funcionamento da via Wnt têm sido investigadas e relacionadas a inúmeras condições como desordens ósseas, desordens metabólicas, doenças neurodegenerativas e também, em

diversos tipos de câncer. Quanto ao processo de carcinogênese, este parece ser influenciado pela alteração na distribuição de β -catenina, que por sua vez aumenta a indução da transcrição de genes relacionados à proliferação celular (Karner, Long, 2017; Lo Muzio, 2001; Lustig, Behrens, 2003; Polakis, 2000; Polakis, 2012). Até mesmo em desordens potencialmente malignas, como a queilite actínica (QA), foram observadas alterações nos padrões de expressão da β -catenina, correlacionando-a com a transformação maligna destas lesões (Schussel et al., 2011).

As células cancerígenas estão expostas constantemente ao estresse oxidativo e, devido aos mecanismos adaptativos, conseguem, driblar o processo de apoptose. Na fumaça do cigarro, são encontradas grandes concentrações de espécies reativas de oxigênio (ERO), que estão intimamente ligadas ao aumento do estresse oxidativo nas células epiteliais orais (Valavanidis et al., 2009). Estas EROs ativavam o eixo de sinalização Wnt- β catenina e MAP quinases, que passam a agir como moduladoras destas cascatas. No entanto, estas observações são na maioria de estudos realizados *in vitro*, sendo necessárias maiores investigações da relação do tabaco com a ativação de componentes da via Wnt em vivo. (Sarkar et al., 2019)

A glicoproteína Wnt5a, codificada pelo gene *WNT5A*, é uma proteína de sinalização da família Wnt rica em cisteína, que parece ser importante no desenvolvimento dos órgãos e regular funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, sobrevivência, polaridade, migração e invasão (Gumbiner, 2005; Kikuchi et al., 2011; Kikuchi et al., 2012).

O gene *WNT5A* ativa principalmente o sistema não-canônico, no entanto, também pode atuar ativando ou inibindo a via canônica, dependente de β -catenina. Em algumas neoplasias malignas como câncer de mama, câncer pancreático e melanoma, o *WNT5A* altera a migração celular, por meio da estimulação ou diminuição da expressão de E-caderinas nas membranas

celulares, e consequentemente a adesão celular (Gumbiner, 2005; Kikuchi et al., 2012; Fan et al., 2013)

As cateninas (α , β , e γ) são uma família de proteínas que atuam de forma direta ou indireta com a E-caderina formando o conhecido complexo caderina-catenina, importante para estrutura do citoesqueleto e adesão célula-célula (Barth et al., 1997). A β -catenina, codificada pelo gene *CTNNB1*, se destaca entre as cateninas por apresentar 2 funções biológicas distintas. Ao se apresentar na membrana citoplasmática, como forma ligante à porção citoplasmática da E-caderina, assume o papel na adesão célula-célula e ainda, é responsável por manter a arquitetura tecidual. Ao se apresentar livre no citoplasma, participa na sinalização da cascata da via WNT, ativando a atividade transcricional no núcleo e resultando na expressão de genes alvo, como a ciclina D1 (*CCND1*) e *cMYC*. (Oloumi et al., 2004; Niehrs, 2012; Marchenko et al., 2004).

Sugere-se que a diminuição da expressão de β -catenina na membrana ou o aumento da sua expressão citoplasmática, esteja associada a progressão do CCE bucal e de orofaringe, bem como à agressividade destas patologias (Santoro et al., 2014; Shiah et al., 2016).

O gene *APC*, codificador da proteína APC, recebeu esta denominação ao ser identificado em portadores da polipose adenomatosa familiar e, é responsável por fosforilar e ubiquitinar a β -catenina. Este gene é considerado um gene supressor de tumor, ou seja, inibe a formação do tumor pela regulação do ciclo celular e por consequência a atividade mitótica (Niehrs, 2012; Polakis, 2000). Em relação ao CCE bucal e aos tumores das vias digestivas superiores, a atividade supressora tumoral do gene *APC* parece estar altamente silenciada, seja por meio da perda de heterozigosidade, de mutações ou alterações epigenéticas (Pérez-Sayáns et al., 2012).

O gene *CCND1* é um proto-oncogene, codificador da proteína ciclina D1. Esta proteína exerce sua função chave no ciclo celular, regulando a

progressão da fase G1 para a fase S (Hindus et al., 1994; Polakis, 2000). Alterações na regulação do ciclo celular principalmente em relação a fase G1, são conhecidas por exercerem papel fundamental no processo de carcinogênese de vários órgãos (Scully et al., 2000).

A relação entre a expressão do *CCND1* e o desenvolvimento de CCE bucal, bem como fatores prognósticos, ainda são muito controversos (Myo et al., 2005; Namazie et al., 2002; Kaminagakura et al., 2011). No entanto, a maioria dos estudos relata que o aumento da expressão de *CCDN1*, aumenta a expressão da proteína ciclina D1, o que culmina numa ativação continua do ciclo celular o que por sua vez reflete em estágios mais avançados da doença, alterações e aberrações nas metástases linfonodais e piores prognósticos (Myo et al., 2005; Namazie et al., 2002; Martín-Ezquerria et al., 2010).

As proteínas da família Myc são codificadas pelos proto-oncogenes *l-MYC*, *n-MYC* e *c-MYC*., são reguladoras do ciclo celular e, desempenham papel importante em vários processos como crescimento celular, proliferação, reprogramação metabólica, diferenciação, adesão celular, senescência, angiogênese e ativação imune (Trop-Steinberg et al., 2018).

A superexpressão de *MYC*, em casos de carcinoma de mama, cólon e cabeça e pescoço, tem sido associada a uma menor sobrevida, pior prognóstico, e auto renovação das células-tronco tumorais. O papel do *c-myc* na carcinogênese, de maneira geral, já se encontra bem estabelecido, mas sua relação com CCE bucal ainda não está clara (Pérez-Sayáns et al., 2011; Pérez-Sayáns et al., 2014).

Estudos demonstram a influência da via Wnt na patogênese de diversos carcinomas, que assim como o CCE bucal, apresentam o tabagismo como fator de risco (King et al., 2012; Oguma et al., 2018). Além disso, os genes desta via apresentam-se alterados em desordens com potencial de transformação maligna, como na QA e leucoplasia bucal (Prgomet et al., 2017; Schussel et al., 2011).

Desta maneira, é pertinente avaliar se estes genes também se encontram envolvidos na carcinogênese, com potencial para identificar possíveis fatores prognósticos e alvos terapêuticos futuros e ainda, se estes estão diretamente relacionados ao hábito tabágico.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Investigar o possível envolvimento da via de sinalização Wnt/ β -catenina na carcinogênese bucal, por meio da análise de expressão gênica.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a expressão dos genes *WNT5A*, *APC*, *CTNNB1*, *CCND1* e *MYC*, por meio da técnica de reação em PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), em amostras de CCE bucal de fumantes e não fumantes;
- b) avaliar a expressão dos genes *WNT5A*, *APC*, *CTNNB1*, *CCND1* e *MYC*, por meio da técnica de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), em amostras de mucosa bucal com características de normalidade;
- c) comparar o perfil de expressão das amostras de CCE bucal com as amostras de mucosa normal;
- d) caracterizar o perfil tabágico, etílico e clínico-patológico de ambos os grupos;
- e) correlacionar os dados clínicos com o perfil de expressão gênica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de ética

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos (CEPH) do Instituto de Ciências e Tecnologia (ICT-UNESP), sob o número de parecer 3.334.281 (ANEXO A).

3.2 Seleção das amostras

Para a realização deste trabalho, as amostras de interesse foram divididas em dois grupos, conforme segue:

- a) grupo carcinoma (GCA): constituído por 30 amostras de lesões bucais com diagnóstico histopatológico de CCE, de pacientes fumantes ou não, atendidos para diagnóstico e tratamento no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital e Maternidade Celso Pierro / PUCCAMP – Campinas, Hospital Municipal Mario Gatti, Campinas;
- b) grupo controle (GCO): constituído por 12 amostras de mucosa com aspecto de normalidade, de pacientes tabagistas ou não, submetidos a remoção de algum tipo de lesão benigna em boca. Os pacientes foram atendidos no ambulatório da Disciplina de Propedêutica Estomatológica do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT-UNESP) e são

equivalentes em idade, sexo e hábito tabágico ao GCA.

As informações relacionadas ao exame clínico extra e intra-bucal, consumo de tabaco e álcool, estadiamento e tratamento oncológico, foram coletadas dos respectivos prontuários.

3.3 Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão

- a) inclusão: amostras de pacientes maiores de 18 anos, que assinaram um Termo de Consentimento Livre e esclarecido e ainda, respeitavam os critérios individuais de cada grupo, conforme apresentado no item 3.2;
- b) não inclusão: amostras de pacientes que já foram submetidos a qualquer tipo de tratamento oncológico cirúrgico, radioterápico e/ou quimioterápico em qualquer órgão ou sistema;
- c) exclusão: casos de amostras degradadas ou insuficientes para análise gênica ou casos com prontuários incompletos que prejudiquem a correta identificação e interpretação dos dados.

3.4 Avaliação do grau de dependência de nicotina e perfil tabágico

De acordo com Reichert et al. (2008), para a avaliação do consumo de tabaco devem ser consideradas as seguintes definições:

- a) os indivíduos que fumaram no mínimo 100 cigarros durante a vida e

- que, no momento da coleta permaneciam fumando diariamente ou ocasionalmente são considerados fumantes ou tabagistas ativos;
- b) os indivíduos que nunca fumaram ou fumaram menos que 100 cigarros durante a vida e que não estavam fumando no momento da coleta, são considerados não fumantes;
- c) os indivíduos que fumaram no mínimo 100 cigarros durante a vida e que não estavam fumando no momento da coleta, são considerados ex-fumantes.

No entanto, sabe-se que mesmo após a cessação tabágica, os indivíduos permanecem com risco do surgimento de um câncer em tecido previamente exposto a carcinógenos (Kelloff et al.,1993). Assim sendo, reforça-se que na presente pesquisa, foram considerados como não fumantes, apenas os indivíduos que nunca foram expostos ativamente ao tabaco.

A avaliação da dependência nicotínica foi realizada considerando a pontuação no Teste de Fagerström para Dependência à Cigarros (TFDC) (Fagerstrom, 2012), presente nos prontuários. O TFDC é composto por seis questões, no qual, a pontuação referente à dependência nicotínica varia de: muito baixa (0 a 2 pontos), baixa (3 a 4 pontos), moderada (5 pontos), elevada (6 a 7 pontos) e muito elevada (8 a 10 pontos).

Na análise do perfil tabágico também foram coletadas informações referentes ao consumo do cigarro, tipo, tempo de uso e carga tabágica. A quantificação da carga tabágica é dada em maços-ano (Reichert et al, 2008) e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Carga tabágica} = \frac{\text{nº de cigarros fumados por dia} \times \text{nº de anos de consumo}}{20}$$

3.5 Avaliação do perfil etílico

As informações relacionadas ao consumo de risco do uso de álcool também foram acessadas no prontuário. Para tanto, foi considerada a pontuação obtida na aplicação do *Alcohol Use Disorder Identification Test* (AUDIT).

O AUDIT é um teste composto por 10 questões pontuadas, no qual a somatória pode revelar quatro padrões de consumo de álcool: de 0-7 pontos: uso de baixo risco (provável ausência de problemas devido ao consumo), de 8-15 pontos: uso de risco (provável presença de problemas devido ao consumo), de 16-19 pontos: uso nocivo (provável existência de problemas devido ao consumo) e de 20-40: provável dependência (Moretti-Pires, Corradi-Webster, 2011).

3.6 Extração de RNA

O RNA total isolado de cada amostra foi obtido a partir de fragmentos teciduais, com aproximadamente 0,5 cm³, conservados em *Allprotect tissue reagent* (Qiagen, CA, USA) em freezer -80°C.

A extração foi realizada por meio da técnica do *TRIzol* (Ambion, Inc., Carlsbad, CA, USA), conforme recomendação do fabricante. A descrição do protocolo encontra-se no Apêndice A.

Um microlitro de RNA, de cada uma das amostras, foi utilizado para medir a absorbância a 260 (A260) e 280 (A280) nm no *NanoDrop 2000 spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA). A pureza, foi analisada por meio das proporções A260/A280 e A260/A230. Na proporção A260/A280, valores entre 1,8 e 2,0 indicam ausência de

contaminação com proteína, já para a proporção A260/A230, valores próximos de 1,7 sugerem RNA livre de contaminantes, como *TRIzol* e álcool.

Para a verificação da integridade do RNA, foi utilizada a técnica de eletroforese, executada em gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com coloração com brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Foram consideradas íntegras e por sua vez, utilizadas, apenas as amostras que apresentaram bandas bem definidas e ainda, exibiram a banda referente ao rRNA 28S, com o dobro da intensidade da banda referente ao rRNA 18S.

3.7 Transcrição reversa

As amostras de RNA selecionadas foram tratadas com *DNase I* (*Turbo DNase Treatment and Removal Reagents* - Ambion Inc., Carlsbad, CA, USA), conforme recomendação do fabricante. Para cada 1000 ng do RNA, foi adicionado 1 µL de *Reaction Buffer*, 1,5 µL de *DNase I* e água livre de nuclease até completar o volume de 10 µL.

A solução foi homogeneizada, centrifugada rapidamente e incubada em termociclador a 25°C por 15 min. Em seguida, adicionou-se 1 µL de EDTA e voltou a ser incubado em termociclador a 65°C por 10 min, para finalizar o tratamento.

Ao término do tratamento descrito, a síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT* (Invitrogen, Carlsbad, USA). Para tanto, foi adicionado Enzima mix (contendo *Rnase Out* e *Superscript III*), *Reaction mix* (2,5 µM), *Random hexamers* (2,5 ng/µL) e água livre de nuclease, para um volume final de 20 µL.

O produto da reação foi incubado no termociclador à temperatura de 50°C por 5 min, 50°C por 50 min e 85°C por 5 min. O cDNA resultante foi

diluído (1:5) acrescentando-se 80 µL e armazenado a -20°C até sua utilização.

3.8 Escolha dos *primers*

As sequências dos iniciadores foram confirmadas no site do NCBI/*Gene Bank*, sendo específicas para a espécie *homo sapiens* e homologia (quadro 1 e 2). Os iniciadores para o gene *APC* foram desenhados a partir da sequência fasta, os demais são provenientes da literatura, conforme indicação dos quadros abaixo. Todas as sequencias foram checadas no *Standard Nucleotide - BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) do site NCBI

Quadro 1- Sequência de *primers* dos genes endógenos

Gene	Sequência dos <i>primers</i> 5'→ 3'		Referência
Beta actina (<i>ACTB</i>)	Forward	CCAACCGCGAGAAGATGAC	Alves et al., 2017
	Reverse	GCCGATCCACACGGAGTACT	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>GAPDH</i>)	Forward	CTCTGCTCCTCCTGTTGAC	
	Reverse	TTGACTCCGACCTTCACCTT	
Tubulin, alpha 1c (<i>TUBA1C</i>)	Forward	CCGGGCAGTGTTTGTAGACT	
	Reverse	TTGCCTGTGATGAGTTGCTC	

Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 2 - Sequência de *primers* dos genes alvo

Gene	Sequência dos <i>primers</i> 5'→3'		Referência
WNT5A	<i>Forward</i>	TGGTGCCTGATATCTCAAAGTC	Prado et al., 2009
	<i>Reverse</i>	GAGAAATAACCCCAGAGTAAACTGTAA	
APC	<i>Forward</i>	GCTCAAACCAAGCGAGAAGT	Desenhado pela autora
	<i>Reverse</i>	AACCTGGACCCTCTGAACTG	
CTNNB1	<i>Forward</i>	GGGATGTTTCAACAACCGAATTGT	Santoro et al., 2014
	<i>Reverse</i>	GCTACTCTTTGGATGTTTTCAATGG	
CCND1	<i>Forward</i>	ACAAACAGATCATCCGCAAACAC	Suzuki et al., 2001
	<i>Reverse</i>	TGTTGGGGCTCCTCAGGTTC	
MYC	<i>Forward</i>	TCAAGAGGCGAACACACAAC	Marimuthu et al., 2018
	<i>Reverse</i>	GGCCTTTTCATTGTTTTCCA	

Fonte: Elaborado pela autora.

3.9 Análise da expressão gênica

As análises de expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Microbiologia do ICT-UNESP.

3.9.1 Escolha do gene endógeno

Os genes endógenos foram testados em todas as amostras. Os resultados foram analisados em <http://www.leonxie.com/referencegene.php>, pelo

RefFinder, que integra os programas *geNorm*, *Normfinder*, *BestKeeper* e o método Ct comparativo. Assim, o gene *TUBA1C* foi escolhido como gene referência, pois obteve menor grau de variação de expressão entre as amostras.

3.9.2 Análise da curva padrão

Utilizando-se um *pool*, contendo 10 µL de cDNA de cada uma das amostras do GCO, foi realizada uma curva padrão para cada um dos genes (Figura 2), incluindo o gene endógeno escolhido. Para determinar a eficiência de amplificação (E) foi utilizada a seguinte equação:

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

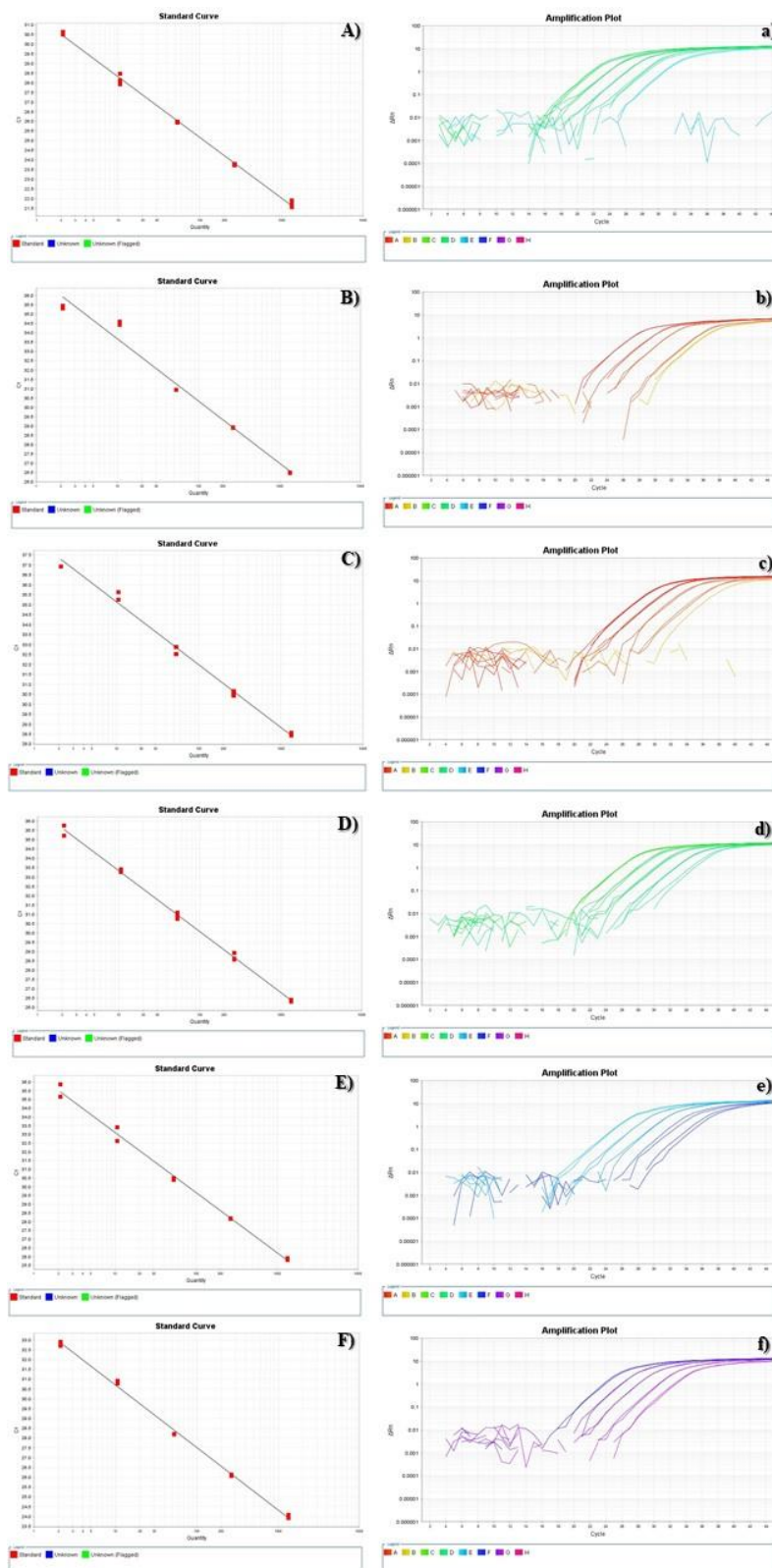
A eficiência de amplificação dos genes alvo e do gene endógeno escolhido foram semelhantes, com variação próxima entre os índices de 90% e 100% ($-3.6 > \text{slope} > -3.1$), conforme observa-se na tabela 1.

Tabela 1 - Valores de *slope* e eficiência (E)

Gene	Slope	R ²	E
<i>TUBA1C</i>	-3,153	0,997	107,846
<i>WNT5A</i>	-3,346	0,978	99,009
<i>APC</i>	-3,168	0,993	106,846
<i>CTNNB1</i>	-3,275	0,998	101,979
<i>CCND1</i>	-3,452	0,994	94,837
<i>MYC</i>	-3,200	0,998	105,376

Fonte: Elaborada pela autora.

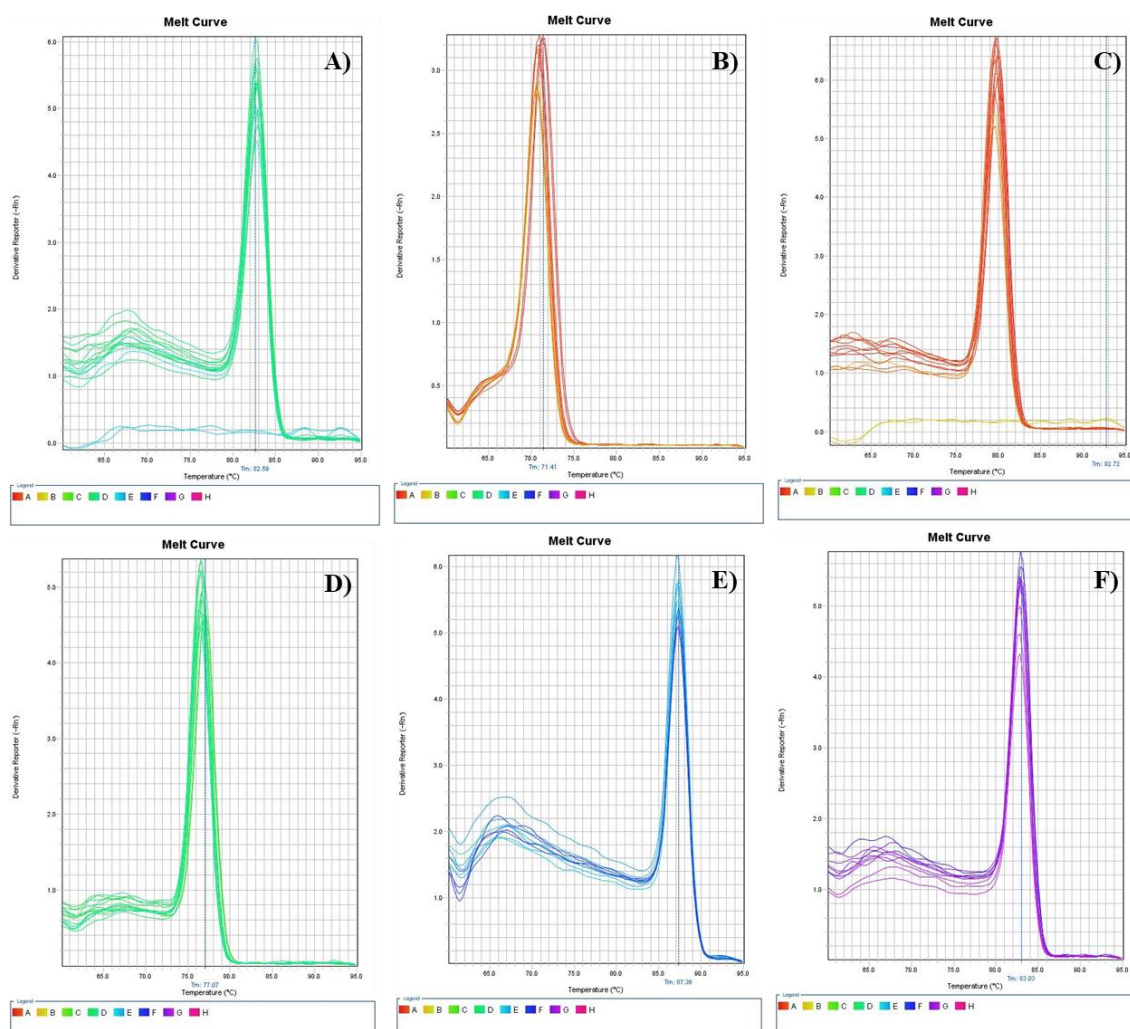
Figura 2 - Curva padrão e curva de amplificação dos genes *TUBA1C* (A, a), *WNT5A* (B, b), *APC* (C, c), *CTNNB1* (D, d), *CCND1* (E, e) e *MYC* (F, f)



Fonte: Elaborada pela autora.

Além da curva padrão e da E, uma curva de dissociação (ou curva de *Melt*) foi estabelecida, estando estas em conformidade das informações obtidas no BLAST e nos artigos referências (Figura 3).

Figura 3 - Curva *Melt* (dissociação) para os genes *TUBA1C* (A), *WNT5A* (B), *APC* (C) *CTNNB1* (D), *CCND1* (E) e *MYC* (F), utilizando-se um *pool* de amostras do grupo CON



Fonte: Elaborada pela autora.

3.9.3 PCR quantitativa em tempo real

Como sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo *SYBR® Green* (Kit *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG*, Invitrogen, Carlsbad, USA). A RT-qPCR foi realizada adicionando-se 10 µL de *SuperMix Platinum SYBR Green*, 1 µL de *ROX*, 10 nM de *primer forward*, 10 nM de *primer reverse*, 4 µL cDNA (previamente diluído) e água livre de nucleases, para o volume final de 20 µL.

A solução foi incubada no aparelho *StepOnePlus™ System* (Life Technologies), sob as condições de amplificação que consistiram em: 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 minutos e mais 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, seguidos por 60 segundos a 60°C. Após o fim do último ciclo, as amostras foram submetidas a análise da curva de dissociação (curva de *Melt*).

As reações da RT-qPCR de cada uma das amostras, foram realizadas em duplicata, em placas de 96 poços. Os dados obtidos das reações foram normalizados a partir da expressão do gene endógeno *TUBA1C*. A quantificação da expressão dos genes alvos escolhidos foi feita utilizando-se o método RT-qPCR, no qual levou-se em consideração a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da reação de amplificação.

Para cada amostra, estabeleceu-se um *Cycle Threshold* (Ct), que se refere ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar. O valor de ΔCt foi determinado subtraindo a média das duplicatas dos valores de Ct do gene alvo, da média das duplicatas dos valores de Ct do gene *TUBA1C*. A determinação do $\Delta\Delta Ct$, foi feita subtraindo o valor de ΔCt de cada amostra do valor da média de ΔCt das amostras normais, sendo este último valor, adicionado à fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O *fold change* do GCA foi estabelecido, referindo-se à quantidade de transcrito para cada amostra (N vezes > ou < que o normal) determinada pela comparação com amostras do GCO.

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism 5.03* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Os dados clínicos foram analisados por meio de estatística descritiva. Para definir a significância estatística, os dados referentes à expressão gênica, foram analisados por meio do teste t de *Student*

As correlações entre os níveis de expressão de genes e as variáveis: idade, consumo de cigarros por dia, anos de consumo e carga tabágica, foram estabelecidas por meio do coeficiente de correlação de Pearson. Já para as variáveis: TFDC, AUDIT e estágio da doença, utilizou-se o coeficiente de Sperman.

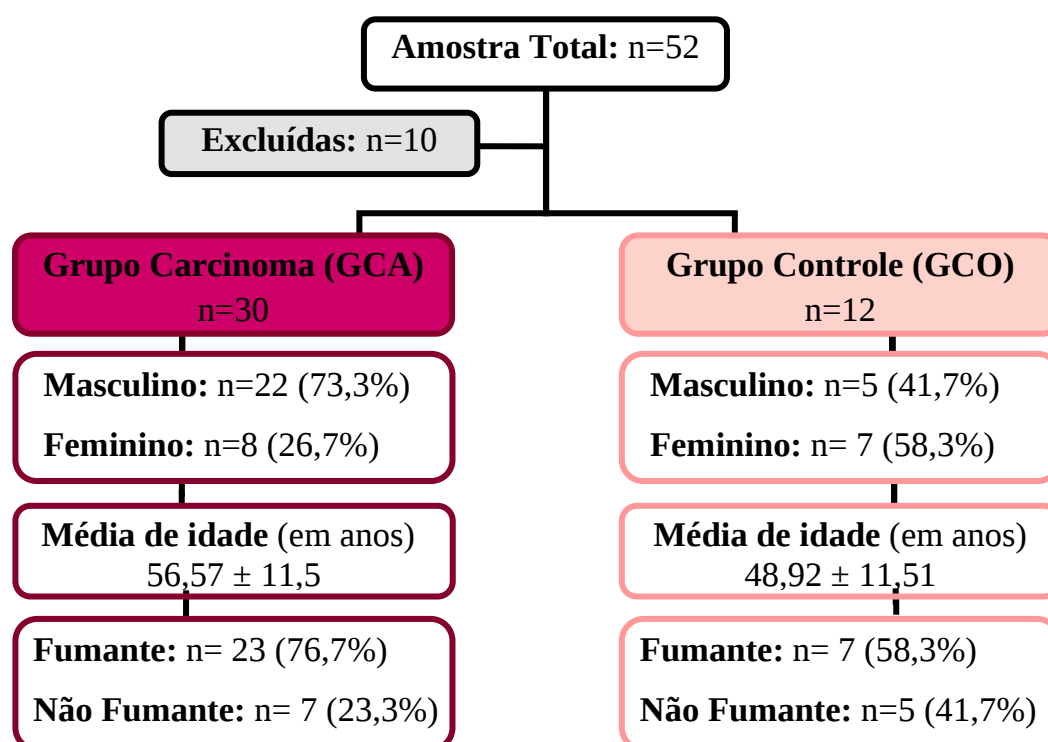
Em todas as análises, adotou-se o índice de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos grupos

Foram selecionadas 52 amostras, entretanto foram excluídas do estudo, 10 das amostras, das quais seis estavam degradadas ou com material insuficiente para realização da transcrição reversa e, quatro (duas por grupo) apresentaram-se como *outliers* na análise de expressão gênica. Ao final, foram consideradas neste estudo 42 amostras, as quais foram divididas em 2 grupos, conforme organograma apresentado na figura 4.

Figura 4 - Distribuição e perfil social dos componentes da amostra



Legenda: Idade descrita em média $\pm$ desvio padrão; n representa o número de componentes.
Fonte: Elaborada pela autora.

No GCA, dos sete pacientes não fumantes, quatro (ou seja, 57,1%) eram mulheres. Já no GCO, quatro (80%) dos não fumantes eram mulheres.

4.1.1 Grupo Carcinoma (GCA)

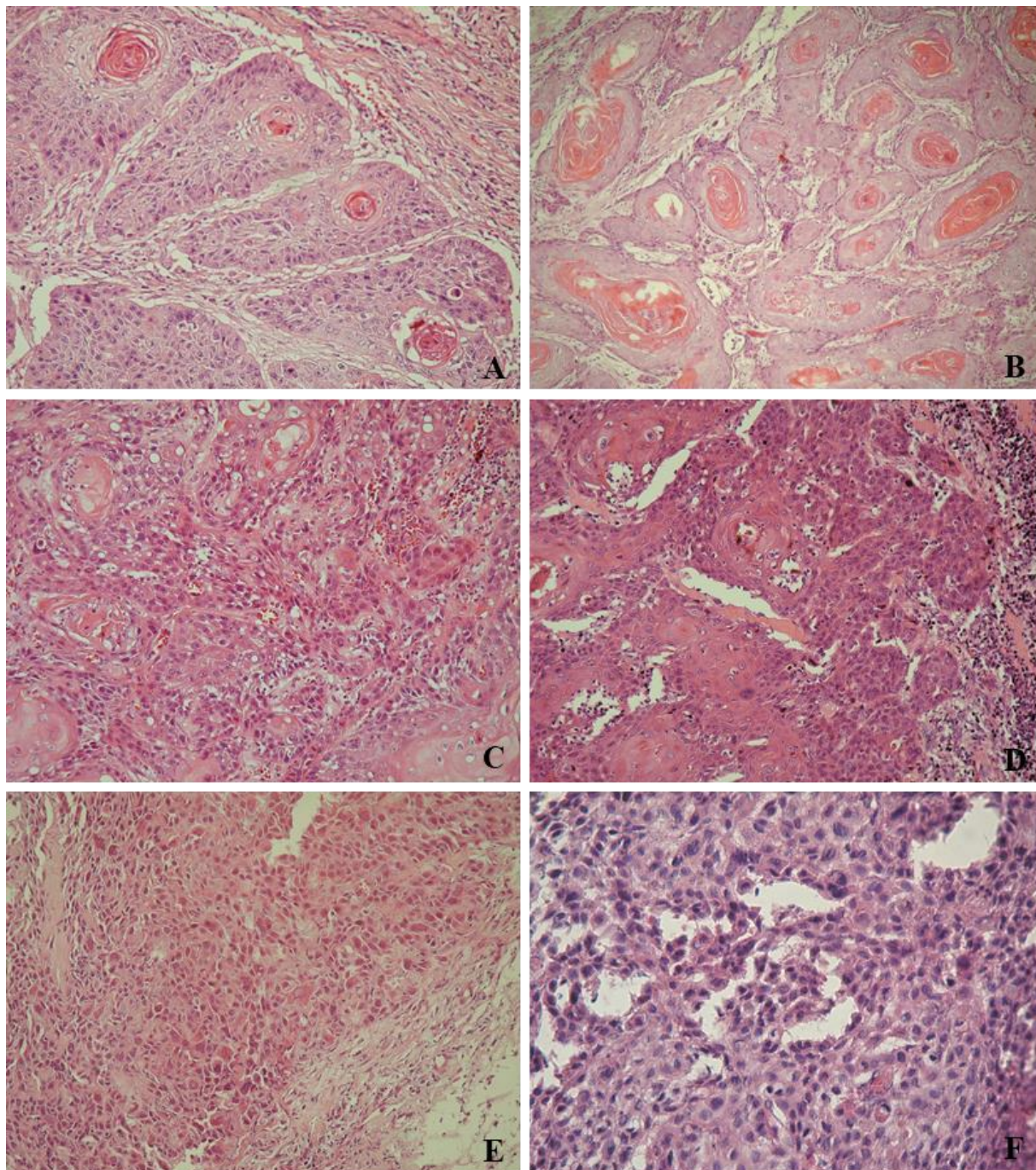
No GCA foram coletadas informações quanto à gradação histopatológica do CCE (Figura 4), localização e estágio da doença (tabela 2). A localização de maior acometimento no GCA foi borda de língua, somando 50% dos casos, seguida por assoalho e região retromolar.

Tabela 2 - Dados epidemiológicos do GCA

Variáveis	n (%)
Amostras	30 (100%)
Localização	
Bordo de língua	15 (50%)
Região retromolar	5 (16,7%)
Assoalho	5 (16,7%)
Gengiva ou rebordo alveolar	4 (13,3%)
Palato mole	1 (3,3%)
Gradação histopatológica	
Bem diferenciado	7 (23,3%)
Moderadamente diferenciado	13 (43,3%)
Pouco diferenciado	3 (6,7%)
Sem dado	8 (26,7%)
Estágio da doença	
Estágio I	3 (10%)
Estágio II	8 (26,7%)
Estágio III	5 (16,7%)
Estágio IV	14 (46,6%)

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 4 - Características histopatológicas do carcinoma de células escamosas em suas diferentes gradações, de acordo com a classificação da OMS



Legenda: Fotomicrografias em hematoxilina e eosina (A, B, C, D, E - aumento 20x) (F - aumento de 40x). Carcinoma de células escamosas bem diferenciado, com presença de múltiplas pérolas de queratina (A, B). Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (C, D) e pouco diferenciado (E,F).

Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação ao estadiamento da doença, dos 19 pacientes (63,3% da amostra) que compreendem os estágios mais avançados III e IV, 15 pacientes eram do sexo masculino enquanto apenas 2 pacientes eram do sexo feminino. Ainda, destes 19 pacientes em estágios mais avançados da doença, 18 eram fumantes e apenas 1 deles era não fumante.

4.1.2 Grupo Controle (GCO)

As 12 amostras (100%) do GCO foram advindas de mucosa bucal sem alterações, obtidas após a remoção de lesões benignas. As amostras do GCO foram divididas por localização, conforme segue: 5 amostras (41,7%) de rebordo alveolar ou gengiva, 3 amostras (25%) de borda de língua, 2 amostras (16,7%) de mucosa jugal, 1 amostras (8,3%) de lábio e 1 amostra (8,3%) de região retromolar.

4.2 Perfil tabágico e etílico

O perfil tabágico e etílico dos pacientes do GCA e GCO foi estabelecido utilizando-se informações colhidas do prontuário, referentes ao TFDC e AUDIT. Ainda que o GCA apresente médias maiores em muitas variáveis, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos somente para TFDC e AUDIT (tabela 3).

Tabela 3 - Perfil tabágico e étílico dos pacientes do GCA e GCO

Variáveis	GCA	GCO	p-valor
Cigarros fumados por dia	18,97 ± 13,19	14,17 ± 20,55	0,236
Idade de início	13,77 ± 9,78	8,66 ± 9,86	0,091
Tempo de uso - em anos	27,23 ± 20,28	19,50 ± 18,83	0,311
Carga tabágica - em maços/ano	34,60 ± 31,28	30,00 ± 42,19	0,361
Teste de Fagerström	4,07 ± 2,97	2,00 ± 2,76	0,024*
AUDIT	9,77 ± 6,99	2,00 ± 4,17	0,018*
Baixo risco	12 (40%)	10 (83,3%)	
Uso de risco	12 (40%)	—	
Uso nocivo	4 (13,3%)	2 (16,7%)	
Provável dependência	2 (6,7%)	—	

Legenda: Dados expressos em média ± desvio padrão; n representa o número de componentes e (%) a porcentagem. GCA: grupo carcinoma. GCO: grupo controle. Valores de p de acordo com o Teste de Mann Whitney.

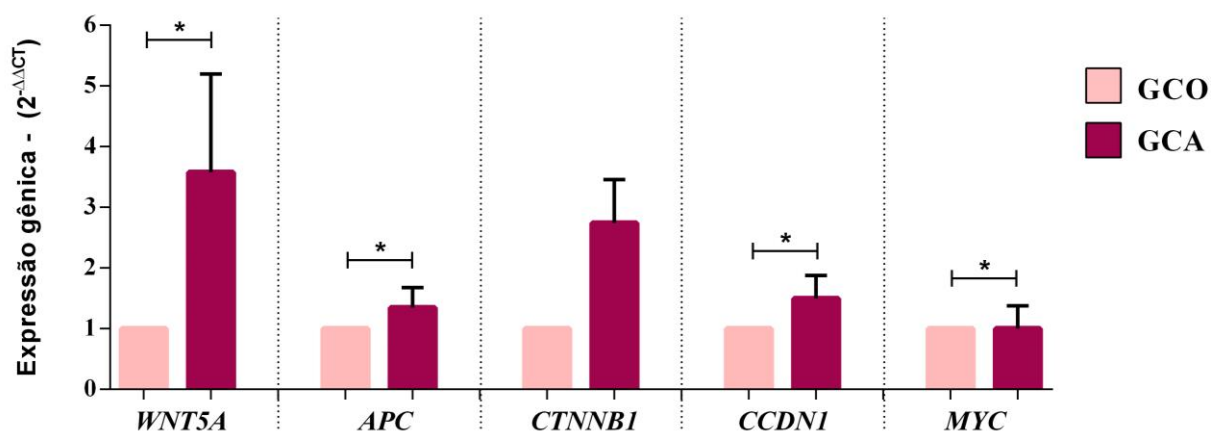
Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Expressão gênica

Os genes alvos estudados apresentaram-se regulados positivamente, ou seja, superexpressos no GCA (Figura 6), com exceção do *CTNNB1*, que embora superexpresso, não apresentou diferença estatística com o GCO

O aumento (*fold increase*) da expressão para os genes *WNT5A*, *APC*, *CTNNB1*, *CCND1* e *MYC* foi respectivamente. de 0,28; 0,74; 0,36; 0,67 e 0,99 vezes, no GCA em relação ao GCO.

Figura 6 - Gráfico de média e erro padrão da expressão genica dos grupos carcinoma e controle



Legenda: Quantificação relativa da expressão de genes alvo *WNT5A*, *APC*, *CTNNB1*, *CCND1* e *MYC*. GCO para o grupo controle (GCO) e grupo carcinoma (GCA). O teste t de Student foi usado para comparar a expressão gênica. Cada gene foi normalizado e comparado com amostras controle. *WNT5A* ($p= 0,034$), *APC* ($p= 0,043$), *CTNNB1* ($p= 0,493$), *CCND1* ($p= 0,049$) e *MYC* ($p= 0,001$). * Indica diferença estatisticamente significante entre os grupos, com valor de $p \leq 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Afim de verificar, se as variáveis clínicas e os hábitos dos pacientes influenciam no padrão da expressão dos genes alvos, no GCA, foi realizada uma série de correlações. Utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson para correlacionar os dados de expressão dos genes alvo e as variáveis: idade, consumo de cigarros/dia, idade de início do consumo, tempo de consumo e carga tabágica (Tabela 4). A expressão do gene *MYC* correlacionou-se de forma significativa e inversamente proporcional com o consumo de cigarros por dia (-3,76; $p=0,040$) e carga tabágica (-3,73; $p=0,043$).

Tabela 4 - Análise de correlação de Pearson entre a expressão dos genes alvo, idade e consumo de cigarros industrializados do GCA

Gene	Idade	Consumo de cigarros/dia	Idade de início do consumo	Tempo de consumo (anos)	Carga tabágica
WNT5A	-0,153	0,037	0,070	-0,176	-0,155
	<i>0,419</i>	<i>0,848</i>	<i>0,715</i>	<i>0,353</i>	<i>0,412</i>
APC	0,107	-0,111	-0,138	-0,064	-0,091
	<i>0,575</i>	<i>0,560</i>	<i>0,469</i>	<i>0,738</i>	<i>0,632</i>
CTNNB1	-0,002	-0,335	-0,138	-0,359	-0,312
	<i>0,993</i>	<i>0,070</i>	<i>0,466</i>	<i>0,051</i>	<i>0,093</i>
CCND1	0,184	-0,241	-0,277	-0,302	-0,243
	<i>0,330</i>	<i>0,199</i>	<i>0,138</i>	<i>0,105</i>	<i>0,196</i>
MYC	0,018	-0,376	-0,275	-0,297	-0,373
	<i>0,925</i>	<i>0,040*</i>	<i>0,142</i>	<i>0,110</i>	<i>0,043*</i>

Legenda: Dados da primeira linha representam o valor do coeficiente de Pearson. Dados em itálico representam o valor de p, para cada uma das correlações estabelecidas. *Indica valor de $p \leq 0.05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

As demais variáveis clínicas foram correlacionadas com a expressão dos genes por meio do coeficiente de correlação de Spearman (Tabela 5). A expressão do gene *CTNNB1* apresentou correlação significativa e inversamente proporcional com o TFDC (-0,405; $p=0,026$) e a gradação histopatológica (-0,419; $p=0,021$).

Utilizou-se ainda o coeficiente de correlação de Spearman para estabelecer a relação entre as variáveis clínicas e hábitos tabágicos e etílicos. O TDFC correlacionou-se com AUDIT (0,545; $p=0,002$), gradação histológica do carcinoma (0,478; $p=0,008$) e com o estágio da doença (0,484; $p=0,007$). E por fim, o AUDIT correlacionou-se com o estágio da doença (0,475; $p=0,009$).

Tabela 5 - Análise de correlação de Spearman entre a expressão dos genes alvo e demais clínicas do GCA

Gene	Sexo	TFDC	AUDIT	Gradação Histopatológica	Estágio da doença
WNT5A	0,013	0,107	0,149	0,057	0,253
	<i>0,945</i>	<i>0,575</i>	<i>0,440</i>	<i>0,766</i>	<i>0,178</i>
APC	-0,044	-0,111	0,118	0,060	-0,030
	<i>0,819</i>	<i>0,558</i>	<i>0,542</i>	<i>0,754</i>	<i>0,874</i>
CTNNB1	0,244	-0,405	-0,013	-0,419	0,053
	<i>0,194</i>	<i>0,026*</i>	<i>0,946</i>	<i>0,021*</i>	<i>0,779</i>
CCND1	0,157	-0,352	-0,288	-0,239	-0,031
	<i>0,408</i>	<i>0,057</i>	<i>0,130</i>	<i>0,203</i>	<i>0,871</i>
MYC	0,253	-0,330	-0,050	-0,070	-0,078
	<i>0,178</i>	<i>0,075</i>	<i>0,797</i>	<i>0,712</i>	<i>0,682</i>

Legenda: Dados da primeira linha representam o valor do coeficiente de Spearman. Dados em itálico representam o valor de p, para cada uma das correlações estabelecidas. *Representa valor de $p \leq 0.05$. TFDC: Teste de Fagerström para Dependência à Cigarros. AUDIT: *Alcohol Use Disorder Identification Test*.

Fonte: Elaborada pela autora.

5 DISCUSSÃO

O estudo das mais diversas vias relacionadas o processo de carcinogênese é de extrema importância, não somente pela possibilidade de descoberta de marcadores e possíveis alvos terapêuticos, mas também pela possibilidade de identificação e confirmação de fatores de risco, o que pode traduzir-se como mais uma ferramenta de prevenção do câncer para pacientes.

Estudos prévios com linhagens celulares, modelos animais e revisões de literatura, já avaliaram a expressão dos genes da via Wnt, relacionado ao processo de carcinogênese, no entanto, até o momento não há um consenso na literatura quanto ao seu papel no CCE bucal (Lakshminarayana et al., 2018; Liu, Millar, 2010; Shiah et al., 2016). Assim, o presente trabalho se torna um dos primeiros estudos, a investigar o papel dos genes *WNT5A*, *APC*, *CTNNB1*, *CCND1* e *MYC* da via Wnt na carcinogênese bucal e a correlacionar tais achados ao perfil clínico, tabágico e histopatológico dos pacientes.

O CCE bucal representa aproximadamente 10% de todos os casos das neoplasias malignas de cabeça e pescoço, colocando-o entre as cinco neoplasias mais incidentes do mundo (Curry et al., 2014; WHO, 2015). O perfil dos pacientes do grupo GCA deste estudo corrobora com os dados apontados pela OMS e o Instituto Nacional do Câncer (INCA), de que o CCE bucal acomete mais homens, acima de 40 anos, tabagistas e etilistas (INCA, 2018; WHO, 2015). Reafirmando este perfil de uso crônico de tabaco e álcool dos pacientes com carcinoma, o GCA obteve maiores pontuações do TFDC e AUDIT, quando comparado ao GCO.

Embora já esteja bem estabelecido no CCE bucal os fatores de risco e a maior prevalência do sexo masculino, os dados obtidos no presente trabalho apontaram uma predominância de mulheres (57,1%) entre os não fumantes do

GCA. Fato concordante aos relatos da última década, na qual há um número crescente de pacientes jovens, do sexo feminino, sem fatores de risco associados, que desenvolvem CCE com maior grau de severidade e pior prognóstico, quando comparadas a pacientes fumantes (DeAngelis et al., 2018; Kruse et al., 2010; Koo et al., 2013). Ou seja, atualmente os pacientes não podem apenas ser classificados em um grupo de risco específico, quando se trata de CCE bucal (Leite et al., 2018). A etiologia e o aumento da incidência do CCE bucal em adultos, principalmente mulheres, abaixo de 40 anos, sem fatores de risco, ainda não estão estabelecidas, mas a hipóteses mais prováveis estão sendo relacionadas a herança familiar, histórico de qualquer outro tipo de neoplasia maligna, a influência de fatores nutricionais e biológicos, como infecções pelo papiloma vírus humano (HPV). Entretanto, este último está bem estabelecido como fator de risco para CCE em orofaringe (Leite et al., 2018; Pires et al., 2013; Toporcov et al., 2015).

Em todo o mundo, para os profissionais envolvidos no estadiamento dos tumores de cabeça e pescoço, o diagnóstico precoce ainda permanece como um grande desafio (Bandeira et al., 2017). Embora haja um aumento da veiculação das informações, devido a era tecnológica e, um aumento no número de campanhas de prevenção ao câncer, os pacientes permanecem sendo diagnosticados em estágios mais avançados da doença, o que implica diretamente em baixos índices de cura, pior prognóstico, elevada mortalidade e tratamento de alto custo (Bandeira et al., 2017; Baumann et al., 2016; Stefanuto et al., 2014).

Os dados epidemiológicos do presente trabalho também são um retrato do diagnóstico tardio no Brasil, corroborando com os dados anteriormente apresentados. Na amostra de interesse, 19 pacientes (63,3% da amostra) encontravam-se nos estágios III e IV da doença, sendo que destes apenas 1 era não fumante e 15 eram do sexo masculino. Ainda em relação ao estágio da

doença, outro fato importante elucidado pelo presente trabalho é a correlação positiva entre o AUDIT, relacionado ao hábito etílico, e o estágio da doença, reforçando que quanto maior o consumo de álcool, maior o estágio da doença no momento do diagnóstico.

O efeito sinérgico entre o tabaco e o álcool já se encontra bem estabelecido na literatura. Sabe-se que estes agentes são genotóxicos, ou seja, promovem alterações nos núcleos celulares, podendo desencadear o processo de carcinogênese (Ramirez, Saldanha, 2002). O tabagismo isolado aumenta em cerca de 6 vezes a chance de o indivíduo desenvolver algum tipo de câncer, mas quando em conjunto ao etilismo, esta chance aumenta em 10 vezes (Batista e al., 2008). No GCA este efeito sinérgico pode ser confirmado por meio da correlação direta e positiva entre o TFDC, que representa o hábito tabágico, o AUDIT, que representa o hábito de consumo de álcool. Esta correlação mostra que o hábito de fumar aumenta, na medida em que se aumenta o hábito de beber (Pavanello, 2006).

Outra correlação importante apontada pelo presente trabalho foi entre TFDC, a gradação histopatológica e o estágio da doença, mostrando que quanto maior o hábito tabágico, maior o grau de diferenciação do CCE bucal e maior é o estágio da doença.

Afim de tentar explicar o motivo pelo qual, tumores com características clínicas semelhantes, muitas vezes apresentam comportamento biológico variado, várias formas de gradação histopatológica foram desenvolvidas. De acordo com a OMS a classificação histopatológica se baseia no grau de diferenciação celular (El-Naggar et al., 2017). Tumores que apresentaram arquitetura tecidual semelhante às células do epitélio escamoso e alto grau de queratinização, são considerados bem diferenciados. Quando apresentavam algum grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca queratinização, são considerados moderadamente diferenciados. E por fim, ao apresentarem

células imaturas, numerosas mitoses e queratinização mínima, são considerados pouco diferenciados (El-Nagar et al., 2017; Frare et al., 2016).

No presente trabalho a grande maioria das amostras de CCE bucal, foi classificada como bem ou moderadamente diferenciado, o que corrobora os achados de estudos previamente publicados (Akhter et al., 2011; Frare et al., 2016; Rahaman, Mujib, 2014). Rodrigues et al., 2019 concluíram que o sistema de classificação da OMS é um indicador prognóstico promissor para os casos de câncer em língua e assoalho de boca. No entanto, há controvérsias quanto à influência da gradação histopatológica e o prognóstico do paciente. Isso se deve principalmente à natureza subjetiva da avaliação, tamanho dos fragmentos analisados e ainda, grande heterogeneidade de amostras bem como diferentes localizações (El-Nagar et al., 2017; Frare et al., 2016; Steigen et al., 2020).

Em relação a idade do paciente, vários autores não encontraram diferença entre o prognóstico e a classificação histopatológica dos tumores de pacientes jovens e de pacientes idosos (Benevenuto et al., 2012; Hilly et al., 2013; Udeabor et al., 2012). No entanto, Kaminagakura et al. (2011) apontaram uma maior frequência de tumores pouco diferenciados em pacientes jovens em comparação a pacientes idosos. Frare et al. (2016), concluíram que pacientes mais jovens, mesmo com características clínico-patológicas semelhantes aos demais pacientes, necessitaram de um maior número de modalidades terapêuticas, apresentaram uma maior taxa de recorrência local e menor sobrevida livre de doença em 5 anos.

A via Wnt compreende uma família de sinalizadores importantes e diretamente relacionados a reparação e regeneração de tecidos, que atuam conduzindo os sinais da superfície ao núcleo celular. (Alam, Warburton, 2013). Seja por meio da via canônica (dependente de β -catenina) ou não canônica, a degradação proteolítica da beta-catenina age como um co-regulador transcricional, que vai estimular ou reprimir a transcrição de fatores de

crescimento, metaloproteinases e citocinas (Alam, Warburton, 2013).

Embora alguns autores já tenham estabelecido relação entre a superexpressão da β -catenina e o desenvolvimento ou progressão de desordens potencialmente malignas e CCE bucal (Karner, Long, 2017; Santoro et al., 2014; Schussel et al., 2011), a expressão do gene *CTNNB1*, que a codifica, não se mostrou significativa no GCA da presente pesquisa, quando comparado ao GCO. No entanto, o aumento de sua expressão correlacionou-se a uma menor carga tabágica e casos de carcinoma mais bem diferenciados. Sugerimos que este fato seja semelhante ao apontado por Oliva et al, (2019), no qual pacientes não fumantes e fumantes, compartilham as mesmas alterações genéticas para o processo de carcinogênese e, após a doença estabelecida, esta passa a ser independente do fator de risco.

Ainda que fumantes e não fumantes possam compartilhar das mesmas alterações genéticas para o início da carcinogênese, o tabaco, se mantém como o principal fator de risco o CCE bucal. E parece desencadear efeitos adversos em certos membros da família Wnt, os quais em resposta a este agente extrínseco, aumentam a produção de citocinas (Wang et al., 2017).

Conforme já mencionado na introdução, o tabagismo tem sido citado como um dos fatores que atua na ativação da via Wnt e ainda, que alterações ou perturbações nesta via parecem relacionadas a carcinogênese bucal. No presente trabalho, destacamos a superexpressão dos genes *WNT5A*, *APC*, *CCND1* e *MYC*.

O gene *WNT5A*, tem sido extensivamente avaliado em diferentes tipos de câncer, mas sua função ainda se mostra controversa, pois ora apresenta-se como potencial supressor, ora como promotor de tumor (Pukrop, Binder, 2008; Xavier et al., 2009). Dados obtidos em amostras de lábio, corroboram com o presente estudo, pois também houve aumento da expressão do *WNT5A* nas amostras de carcinoma, quando comparado à QA, o que reforça seu potencial de promotor

tumoral (Xavier et al., 2009). Também, por meio de avaliação imuno-histoquímica, mostrou-se como importante marcador biológico para transformação maligna em casos de displasias epiteliais em boca (Prgomet et al., 2017).

Ainda em relação ao *WNT5A*, já foi sugerido que o referido gene promova o aumento da migração e invasão celular nos casos de CCE bucal por meio de sua íntima relação com as E-caderinas e com a β -catenina, (Prgomet et al., 2017). Em nosso estudo, não houveram correlações significantes com as características que sugeririam maior invasão celular, que no caso são as características histopatológicas e o estágio da doença.

Estudos prévios observaram o silenciamento do *APC*, tanto em linhagens celulares quanto em amostras de CCE bucal. Em relação às mutações, as amostras leucoplasias bucais, diferiram das amostras de CCE, no qual foi observada tanto a ausência quanto a presença de mutações (Huang et al., 1997; Pérez-Sayan et al., 2012; Sikdar et al., 2003; Tsuchiya et al., 2004). Tsuchiya et al., (2004) concluíram que há diferença da expressão do *APC* de acordo com o grau de displasia, em desordens potencialmente malignas, ou com a gradação histopatológica, no CCE bucal.

Ao contrário dos dados já relatados em literatura, na presente pesquisa o gene *APC*, supressor tumoral, apareceu de forma superexpressa e não de forma silenciada como o esperado. Sugerimos que este aumento da expressão seja relacionado a expressão da β -catenina, uma vez que é a proteína APC que realiza sua ubiquitinação. Ainda, devido à complexidade do processo de carcinogênese outros supressores tumorais como *TP53* devem ser investigados, pois podem estar desregulados e mais diretamente ligados aos casos de CCE bucal.

Embora no presente estudo a expressão de *CTNNB1* não tenha sido significativa, a proteína β -catenina, parece exercer um papel crucial no processo

de carcinogênese da boca e da orofaringe, principalmente no que diz respeito a um maior crescimento e agressividade destas patologias (Santoro et al., 2014). A localização, bem como o acúmulo citoplasmático e nuclear de β -catenina está relacionada ao desenvolvimento e prognóstico de desordens potencialmente malignas e lesões malignas da boca (Iwai et al., 2005; Pannone et al., 2010; Takayama et al., 1996). Fato que se justifica pela sua função na adesão célula-célula, na manutenção da arquitetura tecidual e ainda, pela ativação de fatores transcricionais de proto oncogenes como *CCND1* e *MYC* (Oloumi et al., 2004; Niehrs, 2012; Marchenko et al., 2004).

A superexpressão do *CCND1* e *MYC* encontradas nesta pesquisa, vão ao encontro dos achados da literatura, que relacionam a superexpressão desses proto-oncogenes com maior potencial de invasão e agressividade das neoplasias de cabeça e pescoço (Martín-Ezquerria et al., 2010; Pérez-Sayáns et al., 2014). Como ambos atuam na regulação do ciclo celular, anormalidades como mutações ou alterações epigenéticas encontradas nestes genes, favorecem o processo de carcinogênese bucal (Martín-Ezquerria, 2010).

Estudo com linhagem de células de carcinoma de língua, estimuladas pela nicotina, por meio de vapor de tabaco, sugere que esta substância promove ativação da via canônica, uma vez que leva ao aumento da expressão de *MYC* de maneira dose-dependente (Wang et al., 2017).

A correlação obtida entre a expressão de *MYC*, consumo de cigarros por dia e carga tabágica foi significativa, porém inversamente proporcional. Ou seja, a expressão de *MYC* tende a aumentar, quanto menores forem as taxas de consumo de tabaco. Diante disto, sugerimos que embora o tabaco seja o principal fator de risco para o CCE bucal, não houve relação direta com a expressão dos genes da via Wnt. Assim, após a carcinogênese instalada, o fator tabaco passa a não ser mais o principal fator ativador das vias, conforme observado por Oliva et al, (2019), que concluiu que algumas vias de sinalização

e para alterações no processo de carcinogênese são compartilhadas por todos os paciente, sejam eles fumantes ou não.

Estudos futuros são necessários para desvendar os mecanismos exatos pelos quais a via de sinalização Wnt age na carcinogênese bucal, para que estratégias inovadoras de bloqueio desta via possam ser utilizadas nos estágios iniciais da doença.

6 CONCLUSÃO

A via de sinalização Wnt/ β -catenina mostrou-se envolvida na carcinogênese bucal das amostras estudadas, por meio da superexpressão dos genes *WNT5A*, *APC*, *CCND1* e *MYC*. Interessantemente o aumento da expressão de *CTNNB1* correlacionou-se com menor carga tabágica da mesma forma que o *MYC*, ao correlacionar-se com menor número de cigarros diários e menor carga tabágica. Assim, sugere-se que o papel da via Wnt parece ser importante nos estágios iniciais da carcinogênese bucal e que a ativação ou superexpressão dos genes se dá de maneira independente ao hábito tabágico.

Ressalta-se ainda, que o TFDC esteve correlacionado ao perfil etílico, a gradação histológica do carcinoma e ao estágio da doença, sendo que este último se mostrou também correlacionado ao perfil etílico do paciente.

REFERÊNCIAS*

Alam DA, Warburton D. Wingless: developmentally important genes that respond adversely to smoking. *Thorax*. 2013 Aug; 68(8): 703–4. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203249.

Alves MG, Carta CF, de Barros PP, Issa JS, Nunes FD, Almeida JD. Repair genes expression profile of WNT5A, CTNNB1 and CCDN1 in the normal oral mucosa of chronic smokers. *Arch Oral Biol*. 2017 Jan; 73:60-5. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.09.006.

Barth AIM, Näthke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1997; 9: 683-90.

Bandeira CM, de Almeida AA, Carta CFL, Almeida JD, Kaminagakura E. How to improve the early diagnosis of oral cancer? *Braz Dent Sci*. 2017; 20(4): 25-31. doi: 10.14295/bds.2017.v20i4.1439.

Batista AB, Ferreira FM, Ignácio AS, Machado NA, Lima AAS. Efeito do tabagismo na mucosa bucal de indivíduos jovens: análise citomorfométrica. *Rev Bras Cancerol*. 2008; 54(1):5-10.

Bau DT, Chang CH, Tsai MH, Chiu CF, Tsou YA, Wang RF, et al. Association between DNA repair gene CCDN1 polymorphisms and oral cancer susceptibility. *Laryngoscope*. 2010; 120: 2417–22. doi: 10.1002/lary.21009.

Baumann E, Koller M, Wiltfang J, Wenz HJ, Moller B, Hertrampf K. Challenges of early detection of oral cancer: raising awareness as a first step to successful campaigning. *Health Educ Res*. 2016; 31(2):136-45.

Benevenuto TG, Nonaka CF, Pinto LP, de Souza LB. Immunohistochemical comparative analysis of cell proliferation and angiogenic index in squamous cell carcinomas of the tongue between young and older patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012; 20:291-7. doi: 10.1097/PAI.0b013e31823277f6.-xxx.

Califano J, Van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996 Jun 1; 56(11):2488-92.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol.* 2014; 41:217–34.

DeAngelis A, Breik O, Koo K, Iseli T, Nastri A, Fua T, et al. Non-smoking, non-drinking elderly females, a 5 year follow-up of a clinically distinct cohort of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2018 Nov; 86:113-120. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.09.004. Epub 2018 Sep 20.

El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg P. WHO classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC; 2017.

Fan CC, Wang TY, Cheng YA, Jiang SS, Cheng CW, Lee AY, et al. Expression of E-cadherin, Twist, and p53 and their prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013; 139: 1735–1744.

Fagerström K. Determinants of tobacco use and renaming the FTND to the Fagerström Test for Cigarette Dependence. *Nicotine Tob Res.* 2012; 14(1):75-8.

Frare JC, Calone IS, Rangel ALCA, Bueno AG, Morais CF, Nagai HM, Kunz R, et al. Histopathological grading systems analysis of oral squamous cell carcinomas of young patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016 May; 21(3): e285–e298. doi: 10.4317/medoral.20953.

Fontes PC, Correa GHM, Issa PC, Brandão AAH, Almeida JD. Comparison of exfoliative Pap stain and AgNOR counts of the tongue in smokers and nonsmokers. *Head Neck Pathol.* 2008 Sep; 2(3):157-62. doi: 10.1007/s12105-008-0059-0.

Gumbiner BM. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 622–634.

Hilly O, Shkedy Y, Hod R, Soudry E, Mizrachi A, Hamzany Y, et al. Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: comparison with patients older than 60 years. *Oral Oncol.* 2013; 49:987-90.

Huang JS, Chiang CP, Kok SH, Kuo YS, Kuo MY. Loss of heterozygosity of APC and MCC genes in oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med.* 1997; 26(7): 322-6.

Hurlstone A, Clevers H. T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J.* 2002; 21: 2303–11.

Hindus PW, Weinberg RA. Tumor suppressor gens. *Curr Opin Genet Dev*. 1994; 4:15-141.

Instituto Nacional do Câncer - INCA. Estimativa 2018/2019 Incidência de Cancer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA Instituto Nacional do Câncer; 2018 [acesso em 2018 Dez 10] Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>

Iwai S, Katagiri W, Kong C, Amekawa S, Nakazawa M, Yura Y. Mutations of the APC, beta-catenin and axin1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma. *J Canc Res Clin Oncol*. 2005; 131(12):773–82.

Kaminagakura E, Werneck da Cunha I, Soares FA, Nishimoto IN, Kowalski LP. CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Head Neck*. 2011;33:1413-9.

Karner CM, Long F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(9):1649-1657. doi: 10.1007/s00018-016-2425-5.

Kelloff GJ, Boone CW, Steele VK, Perloff M, Crowell J, Doody LA. Development of chemopreventive agents for lung and upper aerodigestive tract cancers. *J Cell Biochem*. 1993;17F(Suppl):2-17. doi: 10.1002/jcb.240531003.

Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011; 291:21-71. doi: 10.1016/B978-0-12-386035-4.00002-1.

Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol*. 2012; 204: 17–33.

King TD., Zhang W, Suto JM, Li Y. Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. *Cell Signal*. 2012 Apr;24(4):846-51. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.12.009.

Koo K, Barrowman R, McCullough M, Iseli T, Wiesenfeld D. Non-smoking non-drinking elderly females: a clinically distinct subgroup of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013; Aug;42(8):929-33. doi: 10.1016/j.ijom.2013.04.010.

Kruse AL, Bredell M, Grätz KW. Oral squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients. *Head Neck Oncol*. 2010 Oct 4;2:24. doi:

10.1186/1758-3284-2-24.

Lambert R, Sauvaget C, de Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Aug; 23(8):633-41. doi: 10.1097/MEG.0b013e3283484795.

Lakshminarayana S, Augustine D, Rao RS, Patil S, Awan KH, Venkatesiah SS, et al. Molecular pathways of oral cancer that predict prognosis and survival: A systematic review. *J Carcinog*. 2018 Dec 31;17:7. doi: 10.4103/jcar.JCar_17_18.

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jan; 11(1):9-22. doi: 10.1038/nrc2982.

Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2018 May; 18(5):269-82. doi: 10.1038/nrc.2018.11.

Leite AA, Leonel ACLDS, Castro JFL, Carvalho EJA, Vargas PA, Kowalski LP, et al. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathological study on 194 cases in northeastern Brazil. A cross-sectional retrospective study. *Sao Paulo Med J*. 2018 Mar 22;136(2):165-9. doi: 10.1590/1516-3180.2017.0293061217.

Liu F, Millar SE. Wnt/beta-catenin Signaling in Oral Tissue Development and Disease. *J Dent Res*. 2010 Apr;89(4):318-30. doi: 10.1177/0022034510363373

Lo Muzio L. A possible role for the WNT-1 pathway in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(2): 152-65.

Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003;129(4):199-21

Marchenko ND, Marchenko GN, Weinreb RN, JD Lindsey, Kyshtoobayeva A, Crawford HC, et al. β -Catenin regulates the gene of MMP-26, a novel matrix metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 942–56

Moretti-Pires RO, Corradi-Webster CM. Adaptation and validation of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) for a river population in the Brazilian Amazon. *Cad Sau Publica*. 2011;27(3):497-09.

Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Dec; 13(12):767-79. doi: 10.1038/nrm3470. Epub 2012 Nov 15. Review.

Martín-Ezquerro G, Salgado R, Toll A, Gilaberte M, Baró T, Quittlet FA, et al. Multiple Genetic Copy Number Alterations in Oral Squamous Cell Carcinoma: Study of MYC, TP53, CCDN1, EGFR and ERBB2 Status in Primary and Metastatic Tumours. *Br J Dermatol.* 2010 Nov;163(5):1028-35. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.09947.x.

Myo K, Uzawa N, Miyamoto R, Sonoda I, Yuki Y, Amagasa T. Cyclin D1 gene numerical aberration is a predictive marker for occult cervical lymph node metastasis in TNM stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 2005; 104:2709–16. doi: 10.1002/cncr.21491.

Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M, et al. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope* 2002; 112:472–81. doi: 10.1097/00005537-200203000-00013.

Oguma J, Ozawa S, Kazuno A, Nitta M, Ninomiya Y, Kajiwarra H. Wnt3a expression is associated with poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2018 Mar; 15(3): 3100–8. doi: 10.3892/ol.2017.7666

Oliva J, Larque AB, Marti C, Bodalo-Torruella M, Nonell L, Nadal A, et al. Oral premalignant lesions of smokers and non-smokers show similar carcinogenic pathways and outcomes. A clinicopathological and molecular comparative analysis. *J Oral Pathol Med.* 2019 Apr 21. doi: 10.1111/jop.12864.

Oloumi A, McPhee T, Dedhar S. Regulation of E-cadherin expression and β -catenin/Tcf transcriptional activity by the integrin-linked kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1691:1-15

Pannone G, Bufo P, Santoro A, Franco R, Aquino G, Longo F, et al. WNT pathway in oral cancer: epigenetic inactivation of WNT-inhibitors. *Oncol Rep.* 2010; 24(4): 1035-41.

Pavanello MB, Prado FA, Balducci I, Brandão AA, Almeida JD. Cytologic analysis of alterations induced by Smoking and by alcohol consumption. *Acta Cytol.* 2006 Jul-Aug;50(4):435-40.

Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Pilar GD, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, et al. What real influence does the proto-oncogene c-myc have in OSCC behavior? *Oral Oncol.* 2011 Aug;47(8):688-92. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.05.016.

Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Herranz-Carnero M, Gayoso-Diz P, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, et al. The role of the adenomatous polyposis coli (APC) in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2012 Jan;48(1):56-60. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.09.001.

Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Padín-Iruegas E, Gayoso-Diz P, Reis-De Almeida M, Barros-Angueira F, et al. Quantitative determination of c-myc facilitates the assessment of prognosis of OSCC patients. *Oncol Rep.* 2014 Apr;31(4):1677-82. doi: 10.3892/or.2014.3040.

Pires FR, Ramos AB, Oliveira JB, Tavares AS, Luz PS, Santos TC. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci.* 2013 Sep-Oct;21(5):460-7. doi: 10.1590/1679-775720130317.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 2000; 14(15): 1837-51.

Polakis P. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 4(5): pii: a008052. doi: 10.1101/cshperspect.a008052.

Prgomet Z, Andersson T, Lindberg P. Higher expression of Wnt5a protein in oral squamous cell carcinoma compared with dysplasia and oral mucosa with a normal appearance. *Eur J Oral Sci.* 2017 Aug;125(4):237-46. doi: 10.1111/eos.12352.

Pukrop T, Binder C. The complex pathways of Wnt5a in cancer progression. *J Mol Med (Berl).* 2008; 86(3): 259-66

Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinoma. *Genet Mol Res.* 2002; 1: 246-60.

Reichert J, Araujo AJ, Goncalves CM, Godoy I, Chatkin JM, Sales MP, et al. Diretrizes para cessação do Tabagismo. *J Bras Pneumol.* 2008;34(10):845-80.

Santoro A, Pannone G, Papagerakis S, McGuff HS, Cafarelli B, Lepore S, et al. Beta-catenin and epithelial tumors: a study based on 374 oropharyngeal cancers. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:948264. doi: 10.1155/2014/948264.

Sarkar R, Das A, Paul RR, Barui A. Cigarette smoking promotes cancer-related transformation of oral epithelial cells through activation of Wnt and MAPK pathway. *Future Oncol*. 2019 Oct 31. doi: 10.2217/fon-2019-0338.

Schussel JL, Pinto DoS, Martins MT. Altered β -catenin expression related to cancer progression on actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. *Ann Diagn Pathol*. 2011; 15(1):1-5. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2010.07.002.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol*. 2000; 36:256–263.

Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis: past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(3):e306-11.

Shiah SG, Shieh YS, Chang JY. The Role of Wnt Signaling in Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res*. 2016 Feb;95(2):129-34. doi: 10.1177/0022034515613507.

Sikdar N, Paul RR, Panda CK, Banerjee SK, Roy B. Loss of heterozygosity at APC and MCC genes of oral cancer and leukoplakia tissues from Indian tobacco chewers. *J Oral Pathol Med*. 2003; 32(8): 450-4.

Stefanuto P, Doucet J-C, Robertson C. Delays in treatment of oral cancer: a review of the current literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;117(4):424–9.

Steigen SE, S land TM, Nginamau ES, Laurvik H, Costea DE, Johannessen AC, et al. Grading of Oral Squamous Cell Carcinomas - Intra and Interrater Agreeability: Simpler Is Better? *J Oral Pathol Med*. 2020 Jan 3. doi: 10.1111/jop.12990.

Takayama T, Shiozaki H, Shibamoto S et al. β -catenin expression in human cancers. *American Journal of Pathology*. 1996; 148(1):39–46.

Toporcov TN, Znaor A, Zhang ZF, Yu GP, Winn DM, Wei Q, et al. Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Int J Epidemiol*. 2015;44(1):169-85.

Trop-Steinberg S, Azar Y. Is Myc an Important Biomarker? Myc Expression in Immune Disorders and Cancer. *Am J Med Sci*. 2018 Jan;355(1):67-75. doi: 10.1016/j.amjms.2017.06.007.

Tsuchiya r, Yamamoto G, Nagoshi Y, Aida T, Irie T, Tachikawa T. Expression of Adenomatous Polyposis Coli (APC) in Tumorigenesis of Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncol.* 2004 Oct;40(9):932-40. doi: 10.1016/j.oraloncology.2004.04.011.

Udeabor SE, Rana M, Wegener G, Gellrich NC, Eckardt AM. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. *Head Neck Oncol.* 2012;4:28

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health.* 2009, 6(2), 445–462.

Wang C, Xu X, Jin H, Liu G. Nicotine may promote tongue squamous cell carcinoma progression by activating the Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signaling pathways. *Oncology Letters.* 2017; 3479-86.

Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treCCDN1ent of dependence. *Oral Oncol.* 2005; 41: 244–60.

Winn DM. Tobacco use and oral diseases. *J Dent Educ.* 2001;65(4):306–12.

World Health Organization. Fact Sheets by Cancer 2015. Site WHO [Internet]. Suíça: WHO [acesso em 10/03/2018]; Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.

World Health Organization. Tobacco Free Initiative (TFI) 2011. Site WHO [Internet]. Suíça: WHO [acesso em 10/03/2018]; Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/en/>

Xavier FC, Rodini CO, Ramalho LM, Mantesso A, Nunes FD. WNT-5A, but not matrix metalloproteinase 3 or beta-catenin protein, expression is related to early stages of lip carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38(9): 708-15.

Zeng CM, Chen Z, Fu L. Frizzled Receptors as Potential Therapeutic Targets in Human Cancers. *Int J Mol Sci.* 2018 May 22; 19(5). pii: E1543. doi:10.3390/ijms19051543.

APÊNDICE A – Protocolo de Extração de RNA – método *TRIzol*

ETAPA 1: Lavagem das amostras.

- Retirar as amostras do freezer -80°C e passá-las, individualmente, em 3 banhos de *Nuclease free water* (*Invitrogen, Carlsbad, USA*).
- Removê-las da água e colocar para secar brevemente em temperatura ambiente.

ETAPA 2: Trituração, *TRIzol* e Clorofórmio

- Depois de seca, colocar a amostra em um cadinho de porcelana, verter o nitrogênio líquido e, com auxílio de um pistilo, realizar a trituração.
- Sobre o tecido triturado, adicionar 1 mL de *TRIzol* (*Ambion, Inc., Carlsbad, CA, USA*), realizar a homogeneização e em seguida, transferir todo conteúdo do cadinho, para um microtubo apropriado. Em seguida, passar no vórtex por aproximadamente 30 segundos. **OBSERVAÇÃO:** Após a trituração de cada amostra, todos os instrumentais, bem como, o cadinho e o pistilo devem ser lavados, secos e limpos com *RNaseZAP* (*Invitrogen, Carlsbad, USA*).
- Deixar repousar em temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida, colocar as amostras na centrífuga a 14.000 rpm, por 14 min a 4°C.
- Adicionar 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e incubar por 3 minutos em temperatura ambiente. Nota-se que o líquido ficará leitoso. Durante o período de incubação, deve-se agitar as amostras delicadamente, fazendo movimentos delicados de “vai e vem”.
- Colocar as amostras na centrífuga, a 14.000 rpm, por 14 min e a 4°C.

ETAPA 3: Precipitação do ácido nucleico

- Cuidadosamente, remover as amostras da centrífuga, para que as fases não se misturem.



- Aspirar, delicadamente, 500 μ L do sobrenadante, sem que haja contato da ponteira com a interface de proteínas e, colocar em um novo microtubo de 1,5mL. Acrescentar neste novo tubo, 500 μ L de álcool isopropílico 100% (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA) e incubar por 1 hora em geladeira. **OBSERVAÇÃO:** A quantidade de álcool isopropílico será sempre 1:1 de sobrenadante

- Após o período de incubação em geladeira, deixar 10 minutos em temperatura ambiente e em seguida, colocar as amostras na centrífuga a 14.000 rpm, por 14 min a 4°C.
- Tirar da centrífuga e desprezar o sobrenadante, ficando apenas com o *pellet* preso à parede do tubo. Colocar os tubos de ponta cabeça, sobre um papel absorvente para secar brevemente.
- Adicionar 1 ml de álcool etílico 75% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gelado, agitar no vórtex rapidamente, para que o *pellet* se solte e, centrifugar a 14.000 rpm, por 14 min e a 4°C.
- Remover todo o álcool sobrenadante e deixar o *pellet* secar levemente, virando o tubo sobre um papel absorvente, em temperatura ambiente por 10 min.
- Após esse procedimento, adicionar 20 μ L de *RNA Storage buffer* (Ambion Inc., Carlsbad, CA, USA) e incubar a 55°C por 10 min.

OBSERVAÇÃO: ao adicionar o *RNA Storage*, não encostar em nenhuma parede ou em qualquer gota de álcool remanescente. A solução deverá ser colocada sobre o *pellet* e fazer a homogeneização

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TABAGISMO E SUA INTERRELAÇÃO COM LEUCOPLASIA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL: ANÁLISE METABOLÔMICA E

Pesquisador: JANETE DIAS ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13282819.7.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.334.281

Apresentação do Projeto:

O presente trabalho tem como proposição avaliar a expressão gênica e proteica de componentes da via de sinalização WNT e de DNA

metiltransferases (DNMTs) e, bem como o Metaboloma e Microbioma salivar, em casos de leucoplasia e carcinoma de células escamosas (CCE)

bucais. Para a análise de expressão dos genes WNT1, WNT5A, APC, CTNNB1, CCDN1, MYC, WIF1, DNMT1, DNMT3a e DNMT3b, por meio de RTq-PCR

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo

A presente proposta contempla a expressão gênica e proteica de integrantes das vias DNMTs e Wnt, o Metaboloma e Microbioma salivar que possam estar presentes no CCE e leucoplasia, afim de correlacioná-los ao perfil tabágico, etílico, sócio-demográfico e clínico dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Para as amostras correspondentes a avaliação retrospectiva (alíquotas de RNA), os riscos são mínimos, sendo relativos a perda de confidencialidade das informações. Para tanto, os pesquisadores se comprometem a manter os dados em sigilo e segurança. Para as amostras

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph.ict@unesp.br

**UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS**



Continuação do Parecer: 3.334.281

//www2.ict.unesp.br/ – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1350479.pdf	07/05/2019 19:21:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	07/05/2019 19:13:32	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	07/05/2019 19:07:55	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	Dispensa.pdf	06/05/2019 18:31:53	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	06/05/2019 18:30:28	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	06/05/2019 18:07:39	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	carta_colaboracao.pdf	06/05/2019 17:56:04	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 20 de Maio de 2019

**Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador(a))**