

## **ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO TECIDUAL DOS NÍVEIS DE ATYPICAL CADHERIN 1 (FAT 1) E O DIAGNÓSTICO DE DISPLASIA DE BAIXO E ALTO GRAU E CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

ISADORA VILAS BOAS CEPEDA; JUAN PABLO AITKEN SAAVEDRA<sup>2</sup>; SANDRA BEATRIZ CHAVES TARQUINIO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – isadoravbcepeda@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade do Chile – juanpabloaitken@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – sbtarquinio@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

O Carcinoma de Células Escamosas (CEC) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral. Devido ao seu comportamento agressivo e invasivo sua taxa de sobrevida é de em torno de cinco anos (NEVILLE; DAY, 2009). As doenças orais potencialmente malignas são alterações teciduais que podem assumir o caráter de um tumor maligno a qualquer momento e sua detecção e controle precoces são essenciais para evitar a progressão para o Carcinoma de Células Escamosas (NEVILLE; DAY, 2009).

O sequenciamento do genoma do CEC proporcionou uma maior compreensão da complexidade genética e da biologia evolutiva das células tumorais e seu desenvolvimento. Os genes mutados mais comumente associados ao Carcinoma de Células Escamosas são: CASP8, FAT1, NOTCH1, TP53, MLL4 e USP9X (CANCER GENOME ATLAS NETWORK). Sua identificação e associação com a sobrevida e hábitos em pacientes com CEC abre a possibilidade de redirecionar as terapias antitumorais (INDIA PROJECT TEAM OF THE INTERNATIONAL CANCER GENOME CONSORTIUM, 2013).

Dentre as proteínas codificadas por estes genes com mutações no CEC, merece especial atenção a identificação de FAT1, que devido à sua natureza secretória (LI et al., 2016), poderia ser analisada em diferentes fluidos corporais como biomarcador de diferentes doenças. FAT1 tem atua como gene supressor de tumores e quando é inativo ou mutado, poderia permitir o desenvolvimento de vários tipos de câncer (LIN et al., 2004) (ISHIDA et al., 2007; HADDAD; SHIN, 2008). Tem sido estabelecido que mutações em FAT1, especialmente deleções, são um evento determinante no desenvolvimento e progressão do CEC (HU et al., 2017).

A partir dos dados apresentados, o objetivo do presente estudo é identificar, determinar e caracterizar os níveis de FAT1 em biópsias de indivíduos com displasia de baixo e alto grau e CEC, no intuito de propiciar a detecção precoce de CEC e permitir tratamentos na fase inicial dessa doença. Estes poderiam dificultar ou mesmo cessar as mutações agressivas dessa patologia, com melhor prognóstico nestes casos.

### **2. METODOLOGIA**

O projeto de pesquisa, feito em conformidade com as recomendações da Declaração de Helsinke, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFPEL (nº 2.262.681). Foram selecionados dos arquivos do CDDB da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de

Pelotas (UFPEL), 78 blocos de parafina, dentro dos quais, 21 foram de displasias de alto risco, 15 de baixo risco e, 37 de CEC intrabucal e 5 de proliferações epiteliais benignas - papilomas (amostras controles). Os diagnósticos desses laudos correspondentes aos blocos selecionados foram conferidos pela equipe de patologia oral da UFPEL para sua correta classificação. Nos casos de CEC, os resultados foram associados com os hábitos de álcool e tabaco de acordo com a informação coletadas das fichas de biópsia desses pacientes.

Os tecidos foram submetidos à técnica de imunoistoquímica, com o uso do anticorpo para FAT1, segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante (HPA023882; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As etapas de bloqueio da peroxidase endógena, bloqueio de proteína e detecção foram realizadas com soluções prontas para uso fornecidas no kit (Spring BioScience, Pleasanton, CA, EUA).

A reação foi revelada com 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Spring Bioscience Corporation, CA, EUA) e foi contra-corada com hematoxilina de Harris. Segundo a porcentagem de positividade, as amostras foram classificadas em 4 grupos: primeiro grupo (escore 0) é aquele sem marcação, o segundo (escore 1), com positividade entre 1 e 25%, o terceiro (escore 2), com positividade entre 25 e 50% e o quarto grupo (escore 3), com positividade celular maior do que 50%. A quantificação de FAT1 foi avaliada por análise em microscópico de luz, com magnitude de 400x, segundo protocolo estabelecido por Caldeira (CALDEIRA et al, 2015).

Para a realização da análise estatística, foi utilizado o teste de Man-Whitney, o teste Spearman e um modelo de regressão logística ordinal. Foi aceito um nível de significância de 95% e utilizando o software Stata 11.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

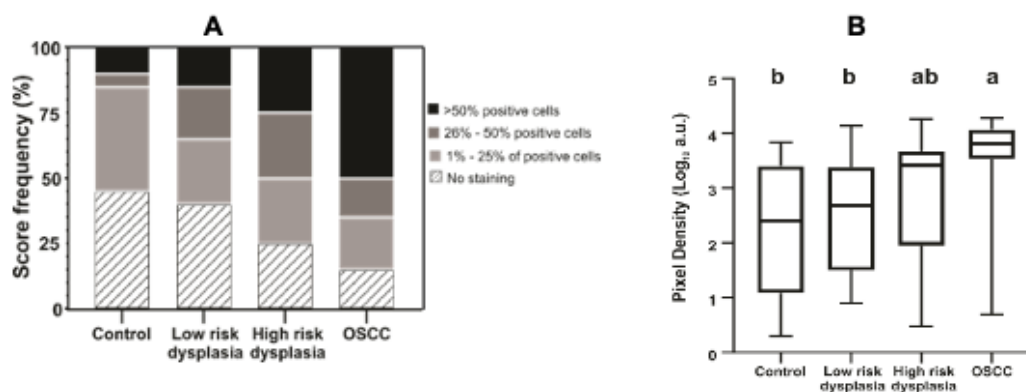
Foram analisadas amostras de 78 pacientes, sendo 5 somente de grupo controle, com o intuito de avaliar e comparar os níveis de expressão imunoistoquímica de Atypical Cadherin 1 (FAT 1) tecidual em espécimes com diagnóstico de displasias de alto e baixo risco e carcinoma espinocelular intrabucal e avaliar seu possível potencial como biomarcador da progressão da doença. A importância de atingir este objetivo seria diminuir a parcela de subjetividade que ainda existe no diagnóstico de displasia, mas fundamentalmente, para detectar lesões em estágios histológicos pré-malignos com métodos não invasivos e fáceis de avaliar e melhorar o prognóstico dos afetados.

A respeito da caracterização epidemiológica das lesões analisadas neste estudo, a raça branca foi a mais afetada em todos os diagnósticos avaliados, fenômeno que também tem sido relatado previamente em outro estudo semelhante (RIBEIRO, 2015). Porém, alguns estudos indicam uma maior frequência de ocorrência de CEC em homens de raça negra (ANDRADE; SANTOS; OLIVEIRA, 2015). Quanto a sexo, os diagnósticos foram mais frequentes em homens (58.3%) (em CEC mais do que 70% eram homens), exceto nas displasias de alto risco, onde a distribuição, embora levemente maior em mulheres, mostrou uma semelhança entre os sexos.

Com relação às idades dos pacientes, observou-se que a média (56.60 anos ( $\pm 18.29$ )) foi semelhante à descrita em outro estudo semelhantes (AITKEN-SAAVEDRA et al., 2017) e não foi observada uma relação entre a expressão imunoistoquímica de FAT1 com a faixa etária e sexo dos indivíduos afetados nem com a localização intraoral das lesões estudadas.

Há uma evidência imunoquímica recente indicando aumento da coloração da proteína FAT1 em comparação com tecidos normais (KUO, et al. 2019). No presente estudo, conforme demonstrado na Figura 1A e 1B, observou-se forte e crescente tendência da expressão do FAT1 pelas análises quantitativas e semiquantitativas, quando comparados os tecidos saudáveis com os casos CEC e displasia pelo método imunoistoquímico. Tecidos saudáveis mostraram menor coloração imunoistoquímica de FAT1 quando comparados a displasias de alto risco e CEC. Quando comparados displasia com CEC, este último apresentou uma maior marcação nas amostras, o que pode ser reflexo de que esta imunomarcação poderia estar mais relacionada com a agressividade do câncer do que com a progressão desde estágios mais iniciais ou pré-malignos (KWAEPILA, 2006). Além disso, metade das amostras de CEC foram positivas para FAT1 (em comparação com 10% em tecidos saudáveis). Esses resultados reforçam as evidências que indicam que o percentual de mutação FAT1 no CEC (mesmo com frequências variando de 7% a 80%), é estimado próximo a 50% (KUO, et al. 2019).

Figuras 1A e 1B: Análise semiquantitativa e determinação computadorizada da coloração da FAT1



Um estudo realizado por Madan (2016) avaliou o possível papel do FAT1 no controle da hipóxia no meio onde o tumor é desenvolvido. O controle deste ambiente poderia ser fundamental para melhorar as condições locais e evitar a progressão e agressividade local tumoral (MADAN, 2016).

#### 4. CONCLUSÕES

A FAT1, que é um dos quatro genes mais associados com a patogênese e progressão de câncer bucal, oferece potencialidade como marcador biológico do CEC bucal. No presente estudo, observou-se que mais da metade dos casos de CEC tinha acima de 50% das células neoplásicas imunopositivas para FAT1, embora quando comparado com as lesões potencialmente malignas não foi observada uma relação que possa indicá-lo como marcador de progressão desde estágios mais iniciais. Pelo fato de ser um gene que codifica uma proteína de secreção, com potencialidade para ser identificada no sangue e na saliva, estudos futuros são necessários para que possa ser feita a sua identificação em indivíduos com câncer e lesões potencialmente malignas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. O. M.; SANTOS, C. A. S. T.; OLIVEIRA, M. C. Fatores associados ao câncer de boca: um estudo de caso-controle em uma população do Nordeste do Brasil. **Revista brasileira epidemiologia**, vol.18, n.4, p. 894-905, 2015.

ALDIVIA, A. D.; ADORNO-FARIAS, D.; MATURANA-RAMIREZ, A.; TARQUINIO, S. C.; DA SILVA, K. D.; FERNANDEZ-RAMIREZ, R.; AITKEN-SAAVEDRA, J. P. Frequency and histoclinic pathology of malignant and potentially malignant disorders of oral cavity in Chile **J. Oral Diag**, 2017.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, p. 576-582, 2015.

HADDAD, R. I.; SHIN, D. M. Recent advances in head and neck cancer. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 11, p. 1143–54, 2008.

HU, X.; et al. FAT1 promotes epithelial mesenchymal transition (EMT) via MAPK/ERK signaling pathway in esophageal squamous cell cancer, **Cancer Letters**, 2017.

INDIA PROJECT TEAM OF THE INTERNATIONAL CANCER GENOME CONSORTIUM. Mutational landscape of gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma reveals new recurrently-mutated genes and molecular subgroups. **Nature communications**, v. 4, p. 2873, 2013.

ISHIDA, K.; ITO S.; WADA, N.; DEGUCHI H.; HATA, T.; HOSODA, M.; NOHNO, T. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. **Molecular cancer**, v. 6, p. 62, 2007.

KUO TM, et al. Arecoline N-oxide regulates oral squamous cell carcinoma development through NOTCH1 and FAT1 expressions. **Journal of Cellular Physiology** 2019;1-10.

LI, X., et al. In-depth analysis of secretome and N-glycosylome of human hepatocellular carcinoma metastatic cell lines shed light on metastasis correlated proteins. **Oncotarget**, v. 7, n. 16, p. 22031–22049, 2016.

MADAN, E.; DIKSHIT, B.; GOWDA, S. H.; SRIVASTAVA, C.; SARKAR, C.; CHATTOPADHYAY, P.; SINHA, S.; CHOSDOL, K. FAT1 is a novel upstream regulator of HIF1 $\alpha$  and invasion of high grade glioma. **Int J Cancer**, 2016

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 52, n. 4, p. 195–215, 2002.

RIBEIRO, I. L. A.; MEDEIROS, J. J. M.; RODRIGUES, L. V.; VALENÇA, A. M. G.; N ETO, E. A. L. Fatores associados ao câncer de lábio e cavidade oral. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 3, p. 618-629, 2015.