



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE COMPONENTES DA VIA
DE SINALIZAÇÃO SONIC HEDGEHOG EM DISPLASIA EPITELIAL
ORAL**

ROSANE BORGES DIAS

Salvador – Bahia – Brasil

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE COMPONENTES DA VIA DE
SINALIZAÇÃO SONIC HEDGEHOG EM DISPLASIA EPITELIAL ORAL**

ROSANE BORGES DIAS

Orientadora: Clarissa Araújo Gurgel Rocha

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre

Salvador – Bahia – Brasil

2014

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

D541e Dias, Rosane Borges
Estudo do perfil de expressão de componentes da via de sinalização sonic hedgehog em displasia epitelial oral [manuscrito] / Rosane Borges Dias . - 2014.
71 f.: il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

Orientador: Prof^a. Clarissa Araújo Gurgel Rocha, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

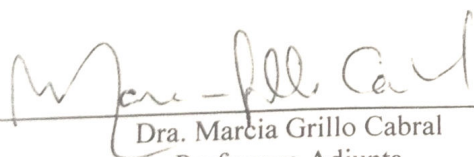
1. Displasia epitelial oral. 2. Proteínas Hedgehog. 3. Imunoistoquímica. I. Título. CDU 616-006.6:577.112

"ESTUDO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE COMPONENTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO SONIC HEDGEHOG EM DISPLASIA EPITELIAL ORAL "

ROSANE BORGES DIAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

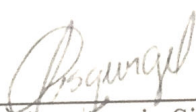
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Marcia Grillo Cabral
Professora Adjunta
UFRJ



Dr. Sergio Marcos Arruda
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ



Clarissa Araujo Silva Gurgel
Professora Adjunta
UFBA

A minha mãe Edite,

Por todo amor, apoio e incentivo incondicional durante esta jornada.

A minha orientadora Clarissa Gurgel,

Por despertar em mim o interesse e amor pela vida acadêmica e pesquisa científica desde a época da BAHIANA e por ter sido fundamental na realização deste sonho.

Agradecimentos

A conclusão do curso de Mestrado consiste em uma grande realização profissional e aqui gostaria de registrar minha gratidão às pessoas que foram essenciais nesta jornada.

Agradeço, primeiramente, a **DEUS**, por estar sempre presente, iluminando meu caminho.

A minha mãe Edite, meu porto seguro, obrigada por todo amor, apoio, incentivo e conselhos sábios durante esta jornada, e principalmente, por estar presente em todos os momentos mesmo com a distância física. Obrigada também por compartilhar, com toda a alegria e satisfação, minhas conquistas e alegrias.

Ao meu pai José Maria, pelo amor, carinho e exemplo de força e fé em minha vida. Agradeço também por incentivar a realização dos meus objetivos e sonhos.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Clarissa Gurgel, por todo apoio e incentivo durante toda a minha vida acadêmica. Muito obrigada pelo convívio, aprendizado e pelas oportunidades em mim depositadas. Saiba que minha admiração, orgulho e carinho por você são enormes.

À Caroline Schlaepfer e Ludmila Valverde, companheiras essenciais durante esta jornada. Obrigada pelo apoio incondicional, aprendizados, conselhos e também por todos os momentos compartilhados. Gosto muito de vocês!

Ao querido Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos, pelo apoio, carinho e imensa contribuição científica durante a realização deste trabalho. Admiro muito seu trabalho!

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos, pelo apoio, colaboração e atenção. Obrigada também por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa.

À Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier, por ter contribuído cientificamente com este trabalho e também por disponibilizar um tempinho para analisar as lâminas de displasias.

Ao meu namorado Paulo Henrique, pelo amor, carinho, paciência, apoio, incentivo e pelos momentos de felicidade compartilhados. Obrigada por me acolher com tanto carinho nos momentos difíceis.

As minhas avós Gertrudes e Isabel, por ser uma fonte inesgotável de amor, carinho e doçura em minha vida e **ao meu Vovô Didi** pelo seu carinho e sabedoria.

Aos meus irmãos, especialmente Rafael, pelo carinho e por acreditarem nos meus sonhos.

Ao meu irmão Wanierbonn e a minha prima Roberta, pelo companheirismo, apoio e por me confortarem nos momentos de angústia.

As minhas primas e irmãs de coração, pelo amor, carinho, amizade e cumplicidade durante toda a minha vida.

Aos meus tios e tias, pelo carinho e torcida.

Aos meus primos, companheiros de toda a minha vida, obrigada pelo apoio, amor, risadas e momentos de alegria compartilhados.

À querida Arlinda, pelas orações, amor e carinho de sempre.

Aos meus queridos amigos, especialmente, Ana Paula Rodrigues, Danilo Araújo, Indira Cavalcanti, Indira Rodrigues, Juliana, Larissa Actis, Larissa Figueredo, Louise Gomes, Maria Edna Dultra, Nuno, Mariana Lessa, Rafael Pedro e Tiago Brandão pelo apoio, incentivo, risadas e momentos de alegria.

Aos colegas da Pós-graduação, especialmente Junia Ferreira, pelo conhecimento e momentos de angústia compartilhados.

À Patrícia Machado e Andréia Carvalho, pelo carinho e apoio.

Aos Professores da Pós-graduação em Patologia, pelos ensinamentos.

Aos bolsistas de iniciação científica Ingrid, Maria Cecília, Milena, Paula, Robson e Vanessa, pela parceria e momentos de descontração durante esta jornada.

À Ana Carvalho e Cristina Mota, pelo auxílio em relação às técnicas de laboratório e pelas vivências compartilhadas.

Ao Serviço de Histotecnologia, especialmente Márcio Ferreira, pela imensa colaboração com o preparo e coloração das lâminas utilizadas neste trabalho.

À Profa. Dra. Márcia Grillo Cabral, pela contribuição científica e por disponibilizar os casos de displasias da UFRJ.

Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM), especialmente Prof. Dr. Mittermayer Reis, pela oportunidade em fazer deste grupo e pela contribuição científica durante as sessões científicas.

À Rosane Passos e Cleiton Guimarães, pela disponibilidade em me ajudar em todos os momentos.

Ao CPqGM (FIOCRUZ), por contribuir com o meu crescimento científico.

À Coordenação de Ensino, especialmente Flávia e Ana Carolina, por colaborar com minhas solicitações e dúvidas.

Ao Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUFBA, pela imensa colaboração na disponibilidade das lâminas deste trabalho.

Aos Professores do curso de Odontologia da BAHIANA, especialmente, Carla Brandão, Elisângela Campos, Érica Ribeiro, Francisco Simões, Gabriela Martins, Maria Emília Ramos, Roberta Naves, Sandro Bittencourt, Tércio Ramos e Urbino Tunes, pelos ensinamentos e aprendizados e pela imensa contribuição com o meu crescimento científico.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro deste trabalho.

DIAS, Rosane Borges. Estudo do perfil de expressão de componentes da via de sinalização sonic hedgehog em displasia epitelial oral. f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

A displasia epitelial oral (DEO) é um aspecto histológico descrito em lesões potencialmente malignas, cujos mecanismos relacionados a patogênese e potencial de transformação são pouco conhecidos. Sabendo-se que a via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH) tem participação no desenvolvimento do carcinoma escamocelular de boca (CEB) e que as proteínas relacionadas a esta via de sinalização estão envolvidas nos mecanismos biológicos relacionados a iniciação e progressão de tumores humanos. O objetivo deste trabalho foi estudar a expressão das proteínas da via de sinalização SHH em DEO, a fim de contribuir para o conhecimento do perfil biológico desta lesão. **Material e Métodos:** As amostras de DEO foram revisadas e classificadas de acordo com o risco de malignidade descrito por Kujan et al. (2006) e OMS (2005). Vinte e cinco casos de DEO foram submetidos a reação imuno-histoquímica para as proteínas SHH, PTCH1, SUFU, HHIP, GLI1 e Ciclina D1 (CCND1) utilizando o sistema polimérico AdvanceTM (Dako). Para fins comparativos, cinco casos de hiperqueratose, oito de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) e quatro de mucosas não-neoplásica (MNN) também foram avaliados. Todos os casos foram analisados de acordo com os parâmetros semi- quantitativos descritos por Gurgel et al. (2008) e os dados foram analisados usando Graph Pad Prism 5.01. **Resultados:** Vinte e um (84%) DEO foram classificados como lesões de baixo risco e 4 (16%) como alto risco. A proteína SHH foi predominante no citoplasma (n =14, sendo 56%) e a positividade de PTCH1 foi observada em membrana e citoplasma (n=23, 92%). As proteínas HHIP e SUFU foram observadas principalmente no citoplasma das células epiteliais e foram positivas em 17 (68%) e 11 (44%) das DEO, respectivamente. GLI1 foi positivo em 21 (84%), principalmente localizada nos núcleos das células epiteliais (n=12; 70,6%). A proteína CCND1 foi exclusivamente no núcleo 19 (76%). Em DEO, os escores predominantes para SHH, PTCH1, HHIP, SUFU, GLI1 e CCND1 foram: 2+ (57,14%), 3+ (73,91%), 3+ (58,82%), 2+ e 3+ (36,36%), 3+ (90,48 %), 1+(47,37 %), respectivamente. Os casos de DEO exibiram maior expressão de HHIP (p=0,02) e GLI1 (p=0,00), em comparação com hiperqueratose. Além disso, níveis elevados de PTCH1 (p=0,05), HHIP (p= 0,01) e CCND1 (p=0,00) foram observados em DEO em comparação com HFI. Ainda, uma maior expressão de PTCH (p=0,01) foi observada nos casos de DEO quando comparados com MNN. **Conclusões:** Os nossos resultados sugerem que a via SHH pode participar da patogênese da DEO e reforçam a relação desta cascata sinalizadora na carcinogênese oral.

Palavras-chave: Displasia epitelial oral, Proteínas Hedgehog, Imuno-histoquímica.

DIAS, Rosane Borges. Study of the expression profile of components of sonic hedgehog signaling pathway in oral epithelial dysplasia. f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Oral epithelial dysplasia (OED) is a histological aspect described in premalignant lesions and the mechanisms related to the pathogenesis and malignant progression are poorly understood. It is known that Sonic Hedgehog (SHH) signaling pathway participates in the development of oral squamous cell carcinoma, and proteins related to this cascade are involved in biological mechanisms related to the initiation and progression of human tumors. The aim of this study was to investigate SHH signaling molecules in OED, in order to contribute to the knowledge of the biological profile of this lesion.

Methods: Samples of OED were reviewed and classified according to the risk of malignancy described by Kujan et al. (2006) and WHO (2005). Twenty five cases of DEO were to submitted to immunohistochemical reactions for SHH, PTCH1, SUFU, HHIP, GLI1 and Cyclin D1 (CCND1) proteins using Advance™ polymer system (Dako). For comparative purposes, five cases of hyperkeratosis, eight inflammatory fibrous hyperplasia (IFH) and four non- neoplastic (NNM) mucosa were also evaluated. All OED were analyzed according to the semi-quantitative parameters described by Gurgel et al. (2008) and the data was analyzed using Graph Pad Prism 5.01. **Results:** Twenty- one (84%) OED were classified as low risk lesions and 4 (16%) as high risk. SHH protein was predominant in cytoplasm (n=14; 56%) and PTCH1 positivity was described in both membrane and cytoplasm (n=23; 92%). HHIP and SUFU proteins were observed in cytoplasm of epithelial cells and were positive in 17 (68%) and 11 (44%) OED, respectively. GLI1 protein was positive in 21 (84%), mainly located in the cells nuclei (n=12; 70.6%). CCND1 protein was exclusively in the nucleus 19 (76%). The predominant scores for SHH, PTCH1, HHIP, SUFU, GLI1 and CCND1 were: +2 (57.14%), +3 (73.91%), +3 (58.82%), +2 and +3 (36.36%), +3 (90.48%), +1 (47.37%), respectively. OED sample had higher levels of HHIP (p=0.02) and GLI1 (p=0.00) as compared to hyperkeratosis. Furthermore, high levels of PTCH (p=0.05), HHIP (p=0.01) and CCND1 (p=0.00) were observed in OED as compared to IFH OED. Also, a high level of PTCH (p= 0.01) was observed in OED as compared to NNM. **Conclusions:** Our results suggest that the SHH pathway may participate in the pathogenesis of DEO and corroborates to the relationship of this signaling cascade in oral carcinogenesis.

Key words: Oral epithelial dysplasia, Hedgehog proteins, Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Componentes e funcionamento da via SHH	22
Figura 2.	Aspectos morfológicos gerais da mucosa bucal não-neoplásica, Hiperplasia fibrosa inflamatória, Hiperqueratose, Displasia discreta, Displasia moderada e Displasia intensa	31
Figura 3.	Imunomarcção de SHH, PTCH1 e SUFU em mucosa bucal não-neoplásica, Hiperplasia fibrosa inflamatória, Hiperqueratose, Displasia epitelial oral	44
Figura 4.	Imunomarcção de HHIP, GLI1 e CCND1 em mucosa bucal não-neoplásica, Hiperplasia fibrosa inflamatória, Hiperqueratose, Displasia epitelial oral	45
Figura 5.	Expressão das proteínas da via SHH entre os grupos Displasia epitelial oral, mucosa não-neoplásica, Hiperplasia Fibrosa Inflamatória e Hiperqueratose	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Critérios arquiteturais e citológicos preconizados pela OMS para o diagnóstico de DEO	25
Tabela 2.	Critérios preconizados pela OMS para classificar o grau da DEO	25
Tabela 3.	Classificação de risco para transformação maligna da DEO proposto por Kujan et al.(2006)	25
Tabela 4.	Dados dos clones dos anticorpos, recuperação antigênica e diluição	27
Tabela 5.	Características clínicas e histológicas dos pacientes com DEO	30
Tabela 6.	Expressão da proteína SHH em DEO	33
Tabela 7.	Expressão da proteína PTCH1 em DEO	35
Tabela 8.	Expressão da proteína SUFU em DEO	37
Tabela 9.	Expressão da proteína HHIP em DEO	39
Tabela 10.	Expressão da proteína GLI1 em DEO	41
Tabela 11.	Expressão da proteína Ciclina D1 em DEO	43
Tabela 12.	Comparação da expressão das proteínas da via SHH entre DEO e MNN, Hiperqueratose e HFI	47
Tabela 1. (Anexo)	Escore de imunomarcção para DEO, MNN, Hiperqueratose e HFI	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetros
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius
%	Unidade de valor percentual
Bcl2	Gene <i>Human B-cell lymphoma 2</i>
CCND1	Ciclina D1
CEB	Carcinoma escamocelular de boca
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DEO	Displasia epitelial oral
DHH	Gene ou proteína <i>Desert Hedgehog</i>
DP	Desvio padrão
et al.	Colaboradores
EI	Escore imuno-histoquímico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
FU	Gene ou proteína <i>serine/threonine kinase fused</i>
GANT58	Bloqueador dos fatores de transcrição GLI
GANT61	Bloqueador dos fatores de transcrição GLI
GLI	Gene <i>Glioma associated oncogene homolog</i>
GLI1	Gene ou proteína <i>Glioma associated oncogene homolog1</i>
HFI	Hiperplasia Fibrosa Inflamatória
HH	Família de ligantes <i>Hedgehog</i>
HHIP	Gene ou proteína <i>hedgehog interacting protein</i>
HPV	<i>Human Papiloma virus</i>
IHH	Gene ou proteína <i>Indian Hedgehog</i>

IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LPM	Lesões potencialmente malignas
NIH	National Institute of Health
OMS	Organização Mundial de Saúde
p53	Gene ou proteína p53
PTCH1	Gene ou proteína <i>Patched 1</i>
PTCH2	Gene ou proteína <i>Patched 2</i>
SCBCN	Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide
SHH	Gene ou proteína <i>Sonic Hedgehog</i>
SMO	Gene ou proteína <i>Smoothened</i>
SUFU	Gene ou proteína <i>Supressor of fused</i>
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VEGF	Proteína <i>Vascular endothelial growth factor</i>
WNT	Do inglês, <i>wingless type</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Displasia epitelial oral	16
2.2	A Via de Sinalização Sonic Hedgehog	18
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Geral	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Considerações éticas	24
4.2	Caracterização do estudo	24
4.3	Estudo histológico	24
4.4	Estudo imuno-histoquímico	26
4.5	Análise imuno-histoquímica	27
4.6	Análise estatística	28
5	RESULTADOS	29
5.1	Aspectos clínicos e histológicos das DEO	29
5.2	Expressão das proteínas SHH, PTCH1, SUFU, HHIP, GLI1 e CCND1	32
5.2.1	SHH	32
5.2.2	PTCH1	34
5.2.3	SUFU	36
5.2.4	HHIP	38
5.2.5	GLI1	40
5.2.6	CCND1	42
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO	67

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A displasia epitelial oral (DEO) é uma lesão potencialmente maligna que está relacionada com uma maior probabilidade de desenvolvimento do câncer de boca, quando comparada com uma mucosa bucal histologicamente normal (WARNAKULASURIYA et al., 2007; LIU et al., 2012).

Conhecer os eventos moleculares prévios ao desenvolvimento do câncer é essencial, já que esta doença constitui um problema de saúde pública em todo mundo e representa uma causa importante de morte em vários países (WARNAKULASURIYA, 2009; SIEGEL et al., 2013). Dentro deste contexto, os tumores malignos localizados na cavidade oral ocupam a sexta colocação entre os cânceres mais comuns no mundo (WARNAKULASURIYA, 2009), sendo o carcinoma escamocelular de boca (CEB) o tipo mais frequente, correspondendo a mais de 90% dos casos (JEMAL et al., 2011). No Brasil, a última estimativa apontou 15.290 novos casos de câncer de boca para o ano de 2014, sendo 11.280 para o sexo masculino e 4.010 para o sexo feminino (BRASIL, INCA, 2013).

As lesões potencialmente malignas (LPM) de boca possuem uma maior probabilidade de transformação para o CEB quando comparadas com o epitélio normal, assim sua detecção precoce representa uma importante estratégia para a prevenção destes tumores (LEE et al., 2000; HOLMSTRUP et al., 2006; LIU et al., 2012). Neste grupo de lesões, destacam-se: a leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica e líquen plano (com ou sem displasia epitelial) (GALE et al., 2005; WARNAKULASURIYA et al., 2007). Apesar da relevância clínica do diagnóstico de LPM, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão dessas lesões são poucos conhecidos. Alguns estudos tem tentado elucidar os eventos moleculares envolvidos na patogênese da DEO, incluindo a participação de vias de

sinalização que possam estar envolvidas na transformação maligna de uma lesão displásica para um tumor invasivo, contribuindo para a identificação de novos marcadores para o diagnóstico, progressão, prognóstico e alvos terapêuticos (WANG et al., 2009). Recentemente, Cavichioli-Buim; Gurgel et al. (2011) demonstraram a participação da via SHH em CEB, através da demonstração da superexpressão dos genes PTCH1, SMO e GLI1 . Baseado nos resultados deste estudo e o conhecimento do potencial de transformação maligna da DEO, o objetivo deste trabalho foi estudar o perfil das proteínas da via de sinalização Sonic Hedgehog em DEO a fim de contribuir para os estudos sobre a patogênese destas doenças.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Displasia epitelial oral

O desenvolvimento do câncer de boca está frequentemente associado à presença de LPM (NEVILLE et al., 2002; GALE et al., 2005; WANG et al., 2009). Neste grupo, destacam-se: a leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica e líquen plano (com ou sem displasia epitelial) (GALE et al., 2005; WARNAKULASURIYA et al., 2007).

Alguns fatores de risco relacionados ao desenvolvimento destas lesões estão descritos na literatura, destacando o uso de tabaco, concomitante ou não ao uso do álcool (BRENNAN et al., 1995; KAWAKITA et al., 2012) e mutações no gene p53 (BOYLE et al., 1993; CRUZ et al., 1998; CRUZ et al., 2002; HELAL et al., 2011). Em adição, alguns estudos demonstraram a presença do Papilomavírus humano (HPV), principalmente os subtipos 16 e 18, em lesões de displasia epitelial oral (MILLER et al., 2001; SZARKA et al., 2009), levantando a hipótese de uma possível relação de causalidade entre a presença do vírus e DEO.

O termo DEO compreende a uma combinação de anormalidades citológicas e distúrbios arquiteturais que conjuntamente são os critérios imprescindíveis para seu diagnóstico histopatológico (JABER et al., 2003; GALE et al., 2005). De acordo com a distribuição das alterações citológicas e arquiteturais no epitélio, as displasias podem ser classificadas em discretas, moderadas e intensas. Quando as alterações encontram-se no terço inferior, tem-se a displasia discreta. A displasia moderada se caracteriza por apresentar alterações arquiteturais e de diferenciação celular se estendendo ao terço médio do epitélio. Por fim, a displasia intensa ocorre quando alterações histológicas estão presentes em mais de dois terços do epitélio (GALE et al., 2005).

Kujan e colaboradores (2006) sugeriram um sistema binário de gradação para DEO, baseado no risco de transformação maligna desta lesão. Nesse sistema, as displasias são classificadas em duas categorias: baixo e alto risco. Neste estudo, os autores avaliaram a variabilidade no diagnóstico e gradação da DEO comparando com a classificação preconizada pela OMS (2005), sendo observada uma maior concordância quando o sistema binário de gradação foi utilizado.

DEO pode ocorrer nas seguintes apresentações clínicas: como uma placa branca (leucoplasia), vermelha (eritroplasia) ou vermelha e branca (eritroleucoplasia/leucoplasia salpicada) (JABER et al., 2003). A leucoplasia e a eritroplasia são definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como placas branca e vermelha, respectivamente, que não podem ser caracterizadas como qualquer outra doença que acomete os tecidos bucais (GALE et al., 2005). Ao mesmo tempo, as eritroplasias e leucoplasias podem estar associadas, determinando um padrão de lesão clinicamente denominado eritroleucoplasia ou leucoplasia salpicada (NEVILLE et al., 2002; BOUQUOT et al., 2006).

Histologicamente, as leucoplasias orais exibem desde atrofia do epitélio até uma hiperplasia com ou sem hiperqueratose. Por outro lado, tipicamente, as lesões eritroplásicas são caracterizadas por um epitélio atrófico e ausência de produção de queratina. Em ambas lesões, quando a DEO está presente, são observadas alterações arquiteturais caracterizadas por estratificação epitelial irregular, aumento do número de células no ciclo celular e mitoses atípicas, além de alterações na diferenciação celular, como variação do tamanho celular e nuclear, pleomorfismo celular, nucléolos proeminentes, hipercromatina e aumento da relação núcleo-citoplasma (GALE et al., 2005).

A localização de uma LPM com displasia parece ter relação com o seu potencial de transformação maligna (LEE et al., 2006). Assim, as lesões localizadas em assoalho de boca e borda lateral da língua parecem ser mais permeáveis aos carcinógenos e por isso possuem maior risco para o desenvolvimento de CEB (REIBEL, 2003).

O principal objetivo de identificar as LPM de boca é prevenir a transformação maligna através de ações, como: mudanças do estilo de vida, eliminação de hábitos deletérios como o fumo e a ingestão de álcool, excisão cirúrgica e crioterapia (HOLMSTRUP et al., 2006).

2.2 A Via de Sinalização Sonic Hedgehog (SHH)

A via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH) exerce um papel fundamental no crescimento e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário de vários órgãos (HASSOUNAH et al., 2012) como dentes (HARDCASTLE et al., 1998), pulmões (GRINDLEY et al., 1997), cólon, mama, esôfago (INGHAN et al., 2001), próstata, estômago (CHARI et al., 2007), sistema nervoso (WETMORE, 2003) e pâncreas (THAYER et al., 2003). Além da sua participação na embriogênese, a via SHH também desempenha um papel na manutenção e crescimento de células-tronco adultas (ALTABA et al., 2002), reparo tecidual (ASAI et al., 2006) e carcinogênese (ALTABA et al., 2002; CHARI et al., 2007; YANG et al., 2010).

Os componentes e o funcionamento da via SHH foram inicialmente descritos em estudos com *Drosophila* (GOODRICH et al., 1997) e a cascata sinalizadora mediada pelas proteínas HH ocorre no cílio primário (KIM et al., 2011), organela formada por projeções da membrana dependentes de microtúbulos, as quais atuam como uma “antena” para captação de sinais extracelulares (HASSOUNAH et al., 2012).

Em humanos, a família Hedgehog (HH) é constituída por três proteínas homólogas, responsáveis pela ativação da via, *Sonic Hedgehog* (SHH), *Desert Hedgehog* (DHH) e *Indian Hedgehog* (IHH). Estas proteínas se ligam aos receptores transmembrânicos *Patched* (PTCH 1 e PTCH 2) e promovem a ativação da via SHH. Com isso, as interações entre as proteínas *Patched* e a *Smoothened* (SMO) são alteradas de forma que o SMO deixa de ser reprimido, iniciando uma cascata de sinalização intracelular que conduz a ativação e translocação nuclear de *GLI*, membro da família do fator de transcrição *GLI-Kruppel*, resultando na regulação positiva de genes alvo da via SHH, como ciclina D1 (CHARI et al., 2007).

O complexo repressor formado pelas proteínas de fusão, *Supressor of Fused* (SUFU) e *Fused* (FU), atua como regulador negativo da via (CHARI et al., 2007). Na ausência da proteína HH, SUFU sequestra a proteína GLI para o citoplasma e a mantém na forma repressora (HASSOUNAH et al., 2012). Por outro lado, na presença do ligante, SUFU acumula-se no citoplasma, mas se dissocia de GLI, promovendo sua ativação e translocação para o núcleo (HUMKE et al., 2010; TUKACHINSKY et al., 2011). Outro componente fundamental da via SHH é o seu inibidor, a proteína HHIP a qual possui afinidade com todos os ligantes *hedgehog* e sua interação com estes medeia a endocitose e degradação destas proteínas (CHARI et al., 2007).

Na ausência do ligante HH, o receptor PTCH atua como um supressor tumoral, através da interação com SMO, que promove a repressão da proto-oncoproteína SMO e impede a ativação dos fatores de transcrição da família GLI (SICKLICK et al., 2006). Os fatores de transcrição GLI ativa a expressão de diversos genes envolvidos em funções relacionadas com o desenvolvimento, tais como a proliferação e diferenciação celular (por exemplo, Ciclina D1 e D2, N-myc, Wnts, PDGFR, IGF2, FoxM1, Foxa2, Nkx2.2, FoxF1, Myf5, HES1, IGFBP3); sobrevivência (Bcl2); auto-renovação e determinação do destino da célula (Bmi1, Nanog);

angiogênese (VEGF); transição epitelial-mesenquimal (Snail1, SIP1, Elk1 e Msx2) e invasão (osteopontina). Além destas funções, GLI1 atua como regulador positivo e PTCH1 e HHIP como reguladores negativos da via e através dessa retroalimentação/*feedback* a cascata sinalizadora pode ser amplificada ou atenuada (HOOPER et al., 2005; PO et al., 2010; STECCA et al., 2010). Os componentes e o funcionamento da via SHH estão ilustrados na figura 1.

Conforme ressaltado anteriormente, o gene Ciclina D1(CCND1) é um dos alvos do fator de transcrição GLI1. Esta proteína exerce um papel fundamental na proliferação celular, regulando a progressão da fase *G1* para a fase *S* no ciclo celular, através da fosforilação e inativação da proteína do retinoblastoma (KATO et al., 1993; WEINBERG, 1995) . A CCND1 é a mais estudada dentre as ciclinas e a sua superexpressão foi relatada em diversos cânceres, como o carcinoma escamocelular de boca (TURATTI et al., 2005; HANKEN et al., 2013).

A participação da via SHH na tumorigênese foi demonstrada, inicialmente, em pacientes com carcinomas basocelulares esporádicos e associados a Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide (GORLIN, 1995; HAHN et al., 1996; JOHNSON et al., 1996; REIFENBERGER et al., 1998; XIE et al., 1998), mas a ativação desta cascata sinalizadora no desenvolvimento e progressão de outras neoplasias já foi demonstrada no câncer de próstata (KARHADKAR et al., 2004; SANCHEZ et al., 2005), câncer de pulmão (WATKINS, et al., 2003; VELCHETI et al., 2007), câncer gastrointestinal (BERMAN et al., 2003; MONZO et al., 2006; DIMMLER et al., 2003; ISOHATA et al., 2009; MA et al., 2005; FELDMANN et al., 2007), câncer de mama (KUBO et al., 2004; KATANO, 2005; MUKHERJEE, et al., 2006), câncer de ovário (CHEN et al., 2007) e hepatocarcinoma (SICKLICK et al., 2006; PATIL et al., 2006; HUANG et al., 2006; CHE et al., 2012).

Em lesões potencialmente malignas, os estudos ainda são escassos, mas existem evidências da participação de componentes da via SHH em lesões precursoras de cólon (ONISCU et al., 2004), colo uterino (XUAN et al., 2006) e pâncreas (THAYER et al., 2003). Em lesões pré-malignas de colo uterino, por exemplo, observou-se uma maior expressão das proteínas IHH, PTCH1, GLI1 quando comparada com tecidos não neoplásicos (XUAN et al., 2006). Ainda, uma maior expressão das proteínas SHH, PTCH1 e SMO foi observada em lesões precursoras do adenocarcinoma de pâncreas (THAYER et al., 2003) e câncer de cólon (ONISCU et al., 2004).

O mecanismo pelo qual as moléculas SHH atuam na carcinogênese não está completamente elucidado, mas tem sido sugerido que mutações no gene PTCH1, superexpressão do ligante *SHH* e ativação dos fatores de transcrição GLI estão relacionados a tumorigênese (WALTERHOUSE et al., 1999; ALTABA et al., 2002). Em CEB, por exemplo, a via SHH pode estar ativada através mecanismos independentes de ligante. (CAVICHIOILLI-BUIM; GURGEL et al., 2011)

A via SHH tem sido estudada como possível alvo terapêutico em tumores (ALTABA, 2008). Dentro dessa expectativa, o bloqueio da via SHH através da droga ciclopamina tem sido estudada “in vitro” em alguns tumores, como CEB (YAN et al., 2011). Esta droga inibe ou reduz a atividade da via SHH por funcionar como antagonista da proteína SMO (TAIPALE et al., 2000). Por outro lado, inibidores terapêuticos que atuam no núcleo para bloquear a função de GLI, como o GANT61, podem ser mais eficazes no bloqueio da via SHH em neoplasias. A droga GANT61 impede a ligação das proteínas GLI com o DNA, e assim, impedindo a ativação da via (LAUTH et al., 2007).

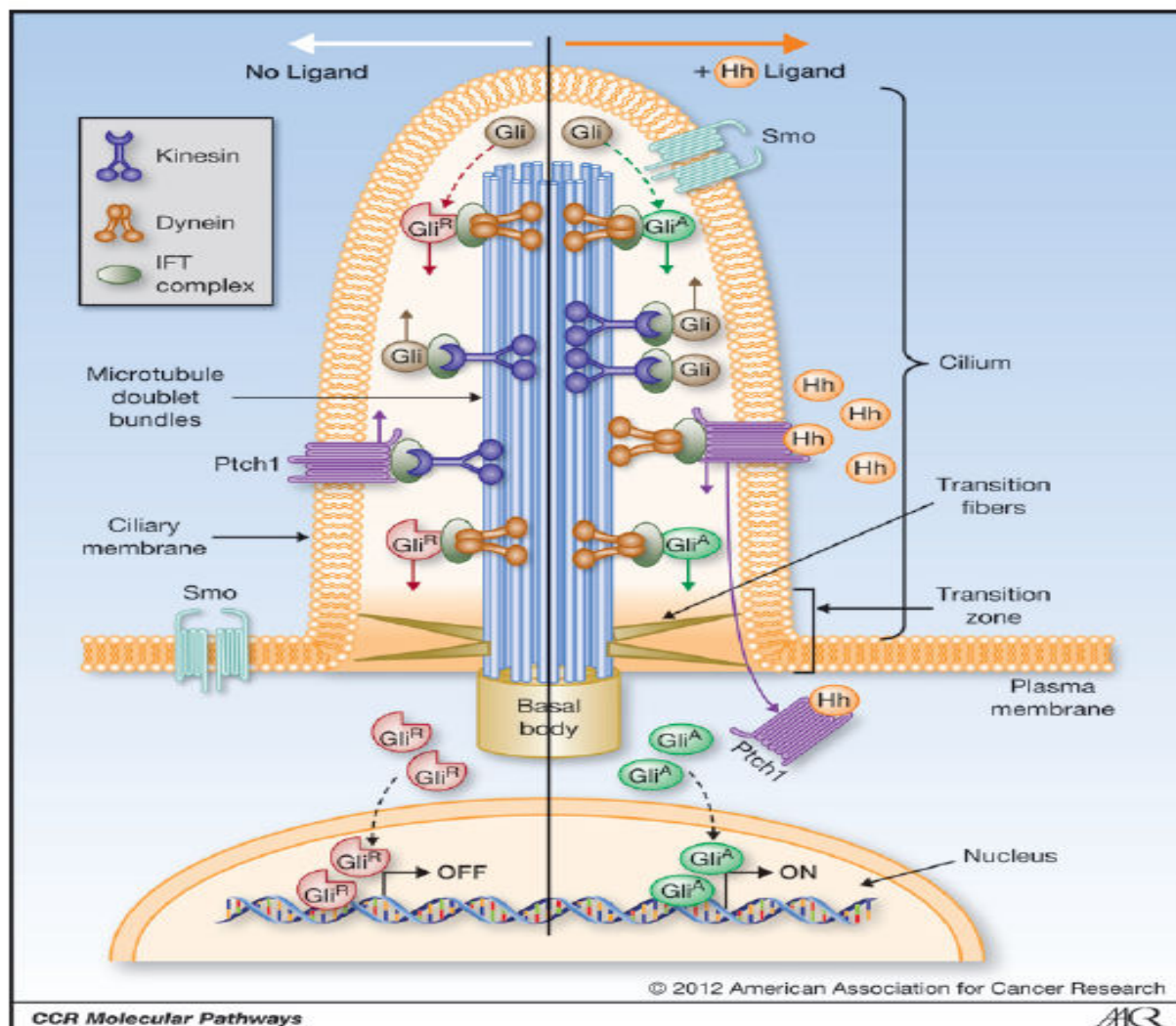


Figura 1. Componentes e o funcionamento da via Sonic Hedgehog. Regulação da via SHH no cílio primário de células normais. Na ausência do ligante HH (à esquerda), o fator de transcrição GLI encontra-se na sua forma repressora (GLI-R). Além disso, na ausência de HH, PTCH1 está localizado na membrana ciliar e SMO é mantido fora do cílio. Na presença do ligante HH (à direita), os níveis da proteína GLI aumentam no cílio e GLI é transformada na sua forma ativa (GLI-A) e translocada para o núcleo onde ativará genes alvos da via SHH. Fonte: HASSOUNAH et al., 2012.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo a estudar o perfil de expressão das proteínas da via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH, PTCH1, SUFU, HHIP, GLI1 e CCND1) em DEO.

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar a expressão das proteínas da via SHH (SHH, PTCH1, SUFU, HHIP, GLI1 e CCND1) em DEO;
- Comparar a expressão das proteínas SHH, PTCH1, SUFU, HHIP, GLI1 e CCND1 entre as lesões de baixo e alto risco de transformação maligna, de acordo com a classificação proposta por Kujan et al. (2006);
- Comparar a expressão das proteínas supracitadas em DEO, lesões reacionais da mucosa oral (hiperplasia fibrosa inflamatória e hiperqueratose) e mucosa não-neoplásica;

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM, FIOCRUZ, Bahia), obtendo parecer número 229/2010.

4.2 Caracterização do estudo

O presente estudo foi de corte transversal, retrospectivo e sua casuística foi composta por 25 casos de DEO, obtidos dos arquivos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA) e da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) entre os anos de 2002 a 2013. Para uma análise comparativa, quatro casos de mucosa bucal não neoplásica, oito de hiperplasia fibrosa inflamatória e cinco de hiperqueratose de indivíduos não fumantes foram selecionados.

Os critérios para inclusão das lesões no trabalho foram: tecido preservado e passível de análise microscópica, dados clínicos e histológicos disponíveis, bem como diagnóstico de DEO localizado na cavidade oral, a qual é representada pela língua (dois terços anteriores), assoalho bucal, palato duro, mucosa jugal, região retromolar e gengiva. Os critérios de exclusão foram: ausência de preservação do tecido; blocos de parafina com pouco material e lesões localizadas em lábio.

4.3 Estudo Histológico

Os casos de DEO foram reavaliados histologicamente por um patologista bucal, de acordo com as alterações arquiteturais e citológicas presentes no epitélio (Tabela 1) e,

posteriormente, classificados segundo o grau histológico em discreta, moderada e intensa (Tabela 2).

Tabela 1. Critérios arquiteturais e citológicos preconizados pela OMS para o diagnóstico de DEO

Alterações Arquiteturais	Alterações Citológicas
Estratificação epitelial irregular	Variação do tamanho nuclear
Perda de polaridade das células basais	Pleomorfismo nuclear
Projeção em forma de gota	Variação do tamanho celular
Aumento do número de mitoses	Pleomorfismo celular
Mitoses anormais	Aumento da relação núcleo-citoplasma
Queratinização prematura individual (Disqueratose)	Aumento do tamanho nuclear
Pérolas de queratina nas projeções epiteliais	Figuras de mitose atípicas
	Nucléolos proeminentes
	Hipercromatismo

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2005.

Tabela 2. Critérios preconizados pela OMS para classificar o grau da DEO

Grau da DEO
<u>Displasia discreta</u> : quando as alterações arquiteturais, acompanhadas de atipia citológica, envolvem o terço inferior do epitélio.
<u>Displasia moderada</u> : quando as alterações arquiteturais, acompanhadas de atipia citológica, estendem-se ao terço médio do epitélio.
<u>Displasia intensa</u> : quando as alterações arquiteturais, acompanhadas de atipia citológica, estendem-se ao terço superior do epitélio.

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2005.

As lesões também foram classificadas segundo o risco de transformação maligna, de acordo com o sistema binário de gradação histológica de DEO proposto por Kujan et al. (2006) (Tabela 3), sendo que essa classificação foi realizada por outro patologista.

Tabela 3. Classificação de risco para a transformação maligna

Classificação de risco
<u>Lesão de alto risco</u> : até quatro alterações arquiteturais e cinco alterações citológicas.
<u>Lesão de baixo risco</u> : menos que quatro alterações arquiteturais ou cinco alterações citológicas.

Fonte: KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncology*, 2006.

4.4 Estudo imuno-histoquímico

Para avaliar a expressão das proteínas SHH, PTCH1, HHIP, SUFU, GLI1 e CCND1 foram utilizados cortes de 4 μ m de espessura obtidos dos espécimes fixados em formol e emblocados em parafina. Os dados sobre a marca comercial, clone e diluição dos anticorpos podem ser observados na tabela 4.

Para a realização da imuno-histoquímica (IHQ), os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol e re-hidratados com álcool. Posteriormente, a recuperação antigênica foi realizada com citrato pH 6,0, em banho maria por 45 minutos, com exceção do anticorpo PTCH1, cuja reação imuno-histoquímica foi realizada sem a etapa de recuperação antigênica.

Posteriormente, as secções foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena (Peroxidase Blocking SolutionTM, Dako, Carpinteria, USA) por 10 minutos e protegido da luz. Logo após, o bloqueio de proteínas teciduais foi efetuado em temperatura ambiente por 10 minutos (Protein Blocking SolutionTM, Dako, Carpinteria, USA).

Em seguida, os anticorpos primários foram incubados por 1 hora em temperatura ambiente, com exceção do anticorpo PTCH1, incubado *overnight*, à temperatura de 4°C. Após lavagem com solução salina Tris Hcl/BSA 1%, os cortes foram incubados com o sistema polimérico de amplificação AdvanceTM (Dako, Carpinteria, USA), por 20 minutos com o reagente *link* e 20 minutos com a enzima. Para revelação utilizou-se 3,3-diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, USA) por 5 minutos, em câmara escura. Por fim, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, desidratados com etanol e diafanizados em xilol, para então proceder a montagem das lâminas em *permount*.

Tabela 4. Dados dos clones dos anticorpos, recuperação antigênica e diluição.

Anticorpo	Marca comercial	Clone	Controle positivo	Recuperação antigênica	Diluição
SHH	Santa Cruz (SC 9024)	Policlonal	Placenta	Citrato pH 6	1:100
PTCH 1	Novus Biologicals (NBP1-47945)	5c7	Placenta	Sem recuperação	1:1000
SUFU	Santa Cruz (SC 28847)	Policlonal	Placenta	Citrato pH 6	1:100
HHIP	Sigma (HPA012616)	Policlonal	Placenta	Citrato pH 6	1:200
GLI 1	Novus Biologicals (NB600-600)	Policlonal	Placenta	Citrato pH 6	1:600
CCND1	Dako	SP4	Carcinoma Epidermóide	Citrato pH 6	1:100

4.5 Análise imuno-histoquímica

Para análise das proteínas levou-se em consideração a localização do antígeno: membranar, citoplasmático e/ou nuclear, em células do epitélio ou tecido conjuntivo. A localização da proteína nos terços epiteliais (inferior, médio e superior) foi analisada de acordo com os critérios da OMS. Além disso, a localização da proteína CCND1 nas camadas basal e suprabasal também foi analisada. As secções histológicas foram exibidas em um monitor LCD widescreen e áreas microscópicas, cinco campos representativos em aumentos finais de 200x e 400x, foram capturadas com auxílio da câmera AxioCam HRc acoplada ao microscópio Zeiss Axioskop. Em seguida, as imagens foram analisadas através do programa Image J (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH - NIH, 1997). Foram contadas células positivas e negativas de cada campo microscópico e utilizada a seguinte fórmula para calcular a proporção de células imunomarcadas: células positivas/ número total de células. Em seguida, foram adotados os seguintes critérios para a semi-quantificação de cada população de células avaliadas: (-) Negativo, até 5% de células imunomarcadas; (1+) Discreta, entre 6-25%

de células imunomarcadas; (2+) Moderada, entre 26-50% de células imunomarcadas; (3+) Intensa, mais de 50% de células imunomarcadas, conforme descrito por Gurgel et al. (2008).

4.6 Análise estatística

Inicialmente, realizou-se a análise descritiva das variáveis estudadas obtendo-se as frequências simples e relativas para todas as variáveis. Em seguida os dados foram submetidos à análise estatística dos dados, através do programa GraphPad Prism versão 6.03 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*).

Os dados referentes a expressão imuno-histoquímica foram analisados segundo a distribuição na curva normal de Gauss e, a partir da análise estatística descritiva destes (Média, Mediana, Desvio Padrão, Curtose e Variância) foram aplicados testes não-paramétricos.

As amostras foram comparadas utilizando os seguintes testes estatísticos:

- Mann-Whitney: para comparar e testar diferenças estatísticas entre duas amostras independentes.
- Kruskal-Wallis: para comparar e testar diferenças estatísticas entre mais de duas amostras independentes.

A análise estatística deste estudo considerou como nível de significância o valor de “*p*” correspondente à alfa (α) menor ou igual a 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Aspectos clínicos e histológicos das DEO

A amostra deste estudo foi composta por 25 casos de DEO, sendo que 11 lesões acometiam homens (44%) e 12 mulheres (48%). A idade dos pacientes variou de 25 a 83 anos, apresentando uma média de idade de 57,14 (DP±17,45). O sítio anatômico predominante foi a mucosa jugal (n=8; 32%), seguido pela língua (n=5; 20%); palato (n=4; 16%); rebordo gengival (n=3; 12%); assoalho bucal (n=2; 8%), nesta ordem. Clinicamente, 17 (68%) casos apresentaram como uma lesão branca (leucoplásica) e, apenas, 1 (4%) caso com o aspecto eritroplásico (lesão vermelha). Não foi possível recuperar os dados de gênero de dois (8%) casos, a idade de quatro (16%) casos, a localização anatômica de três (12%) casos e o aspecto clínico de 7 (28%) de casos.

Considerando a classificação da OMS (2005), 21 (84%) casos foram classificados como displasia discreta, 2 (8%) como displasia moderada, 2 (8%) como displasia intensa. Em adição, baseado no sistema binário proposto por Kujan et al. (2006), 21 (84%) foram classificados como displasia epitelial de baixo risco e 4 (16%) de alto risco.

As características clínicas e histológicas das DEO estão descritas na tabela 5. Os aspectos morfológicos gerais da mucosa bucal não-neoplásica (MNN), hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), hiperqueratose e DEO podem ser visualizados na figura 2.

Tabela 5. Características clínicas e histológicas dos pacientes com DEO.

Parâmetros clínicos e histológicos	n (%)
<u>Sexo</u>	
Feminino	12 (48)
Masculino	11 (44)
Não informado/Não disponível	2 (8)
<u>Localização anatômica</u>	
Mucosa jugal	8 (32)
Língua	5 (20)
Palato	4 (16)
Gengiva	3 (12)
Assoalho bucal	2 (8)
Não informado/ Não disponível	3 (12)
<u>Aspecto clínico</u>	
Leucoplasia	17 (68)
Eritroplasia	1 (4)
Não informado/ Não disponível	7 (28)
<u>Grau histológico (OMS, 2005)</u>	
Discreta	21 (84)
Moderada	2 (8)
Intensa	2 (8)
<u>Risco de malignidade</u>	
Baixo risco	21 (84)
Alto risco	4 (16)

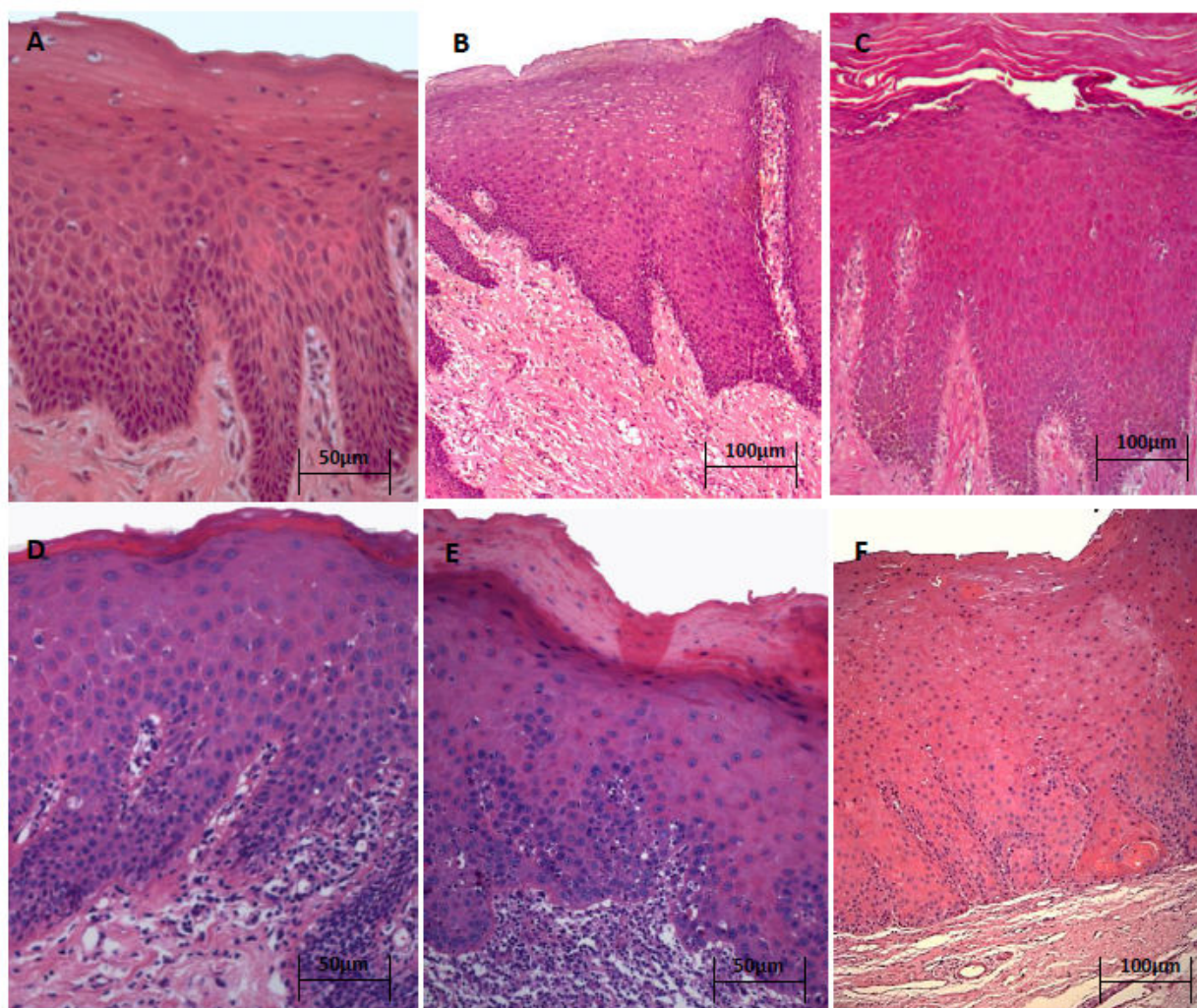


Figura 2. Aspectos morfológicos gerais da mucosa bucal não-neoplásica (A); Hiperplasia Fibrosa Inflamatória (B); Hiperqueratose (C); Displasia discreta/Baixo risco (D); Displasia moderada/Alto risco (E) e Displasia Intensa/ Alto risco (F).

5.2 Expressão das proteínas SHH, PTCH1, SUFU, HHIP, GLI1 e CCND1

5.2.1 SHH

Catorze casos de DEO (56%) foram positivos para a proteína SHH, sendo o escore 2+ predominante (n= 8; 57,14%), seguido do escore 1+ (n=4; 28,57%) e escore 3+ (n=2, 14,29%), nesta ordem. Em todos os casos de DEO, a proteína SHH estava localizada no citoplasma de células epiteliais, especialmente no terço médio do epitélio. A análise descritiva da expressão desta proteína para sexo, localização anatômica, grau histológico e risco de malignidade está representado na tabela 6.

Todos os casos de mucosa não neoplásica e hiperplasia fibrosa inflamatória foram negativos para a proteína SHH e em apenas uma amostra de hiperqueratose foi detectada marcação citoplasmática para a proteína SHH de escore 1+. A figura 3 mostra a imunomarcação de SHH em MNN (Figura 3-A), HFI (Figura 3-B), hiperqueratose (Figura 3-C) e DEO (Figura 3-D). E as comparações entre os grupos de MNN, hiperqueratose, HFI com a DEO estão descritas na tabela 12 e representadas na figura 5.

Tabela 6. Expressão da proteína SHH em DEO.

	SHH		Mediana	Valor de p
	Positivo n (%)	Negativo n (%)		
<u>Sexo*</u>				
Feminino	7 (58,33)	5 (41,67)	112.0	1.0
Masculino	6 (54,55)	5 (45,45)	157.0	
<u>Sítio anatômico**</u>				
Mucosa jugal	6 (75)	2 (25)	198.0	0.16
Língua	1 (20)	4 (80)	0.0	
Palato	2 (50)	2 (50)	88.0	
Gengiva	2 (66,67)	1 (33,33)	184.0	
Assoalho bucal	1 (50)	1 (50)	78.5	
<u>Grau histológico</u>				
Discreta	13 (61,9)	8 (38,1)	160.0	-
Moderada	0 (0)	2 (100)	0.0	
Intensa	1 (50)	1 (50)	78.5	
<u>Risco de malignidade*</u>				
Baixo risco	13 (61,9)	8 (38,1)	160.0	0.13
Alto risco	1 (25)	3 (75)	0.0	

Nota: *Teste de Mann-Whitney; **Teste de Kruskal-Wallis.

5.2.2 PTCH 1

Dos 25 casos de DEO, vinte e três DEO (92%) apresentaram expressão da proteína PTCH1 em membrana e citoplasma de células do epitélio e/ou na lâmina própria. Em 14 (60,87%) casos, a imunomarcção estava presente em ambos compartimento (epitélio e lamina própria) e nas demais DEO (n=9; 39,13%), apenas células epiteliais exibiram positividade para PTCH1. Quando na lâmina própria, a imunomarcção foi de escore 3+ em todos os casos. Avaliando-se apenas o compartimento epitelial, o escore 3+ (n=17; 73,91%) foi predominante, seguido do escore 2+ (n=4; 17,39%) e +1 (n=2; 8,70%). A análise descritiva da imunoexpressão desta proteína para sexo, localização anatômica, grau histológico e risco de malignidade está representado na tabela 7.

Todos os casos de mucosa bucal não neoplásica e hiperqueratose foram positivos para PTCH1, enquanto positividade para esta proteína foi observada em 5 (62,5%) HFI. Em mucosa não neoplásica, a imunomarcção foi observada em membrana das células do revestimento epitelial, com escores 1+ (n=2; 50%) e 2+ (n=2; 50%), além de uma intensa marcação em lâmina própria. Nas hiperqueratoses, a proteína PTCH1 foi detectada no compartimento epitelial e de padrão membranar (n=5; 100%), com escores 2+ (n=3; 60%) e 3+ (n=2; 40%). Em quatro casos, observou-se imunomarcção na lâmina própria. Nos casos positivos de HFI, a proteína PTCH1 estava localizada na membrana plasmática das células epiteliais, sendo que 2 (40%) apresentaram escore 1+, 2 (40%) escore 2+ e 1 (20%) escore 3+. A figura 3 mostra a imunomarcção de PTCH1 em MNN (Figura 3-E), HFI (Figura 3-F), hiperqueratose (Figura 3-G) e DEO (Figura 3-H). E as comparações da expressão de PTCH1 entre DEO, MNN, hiperqueratose e HFI estão descritas na tabela 12 e representadas na figura 5.

Tabela 7. Expressão da proteína PTCH1 em DEO.

	PTCH1		Mediana	Valor de p
	Positivo n (%)	Negativo n (%)		
<u>Sexo*</u>				
Feminino	12 (100)	0 (0)	416.0	0.44
Masculino	11 (100)	0 (0)	374.0	
<u>Sítio anatômico**</u>				
Mucosa jugal	8 (100)	0 (0)	380.5	0.92
Língua	5 (100)	0 (0)	374.0	
Palato	4 (100)	0 (0)	392.0	
Gengiva	3 (100)	0 (0)	723.0	
Assoalho bucal	2 (100)	0 (0)	584.0	
<u>Grau histológico</u>				
Discreta	20 (95,24)	1 (4,76)	415.0	-
Moderada	1 (50)	1 (50)	128.0	
Intensa	2 (100)	0 (0)	442.0	
<u>Risco de malignidade*</u>				
Baixo risco	20 (95,24)	1 (4,76)	415.0	0.20
Alto risco	3 (75)	1 (25)	261.0	

Nota: *Teste de Mann-Whitney; **Teste de Kruskal-Wallis.

5.2.3 SUFU

A proteína SUFU foi detectada em 11 (44%) DEO, sendo que 4 (36,36%) casos foram classificados como escore 3+, 4 (36,36%) escore 2+ e 3 (27,28%) escore 1+. Das 21 DEO de baixo risco, apenas 9 (42,86%) foram positivas, enquanto a proteína SUFU foi presente em todas as DEO de alto risco. O padrão de marcação, para todos os casos, foi em citoplasma de células epiteliais, especialmente o terço médio. A análise descritiva da imunexpressão de SUFU para os sexos, localização anatômica, grau histológico e risco de malignidade está representado na tabela 8.

Os casos de mucosa bucal não neoplásica foram negativos para SUFU, contudo, marcação positiva foi detectada em uma hiperqueratose e uma HFI, ambas de escore 1+. A figura 3 mostra a imunomarcação de SUFU em MNN (Figura 3-I), HFI (Figura 3-J), hiperqueratose (Figura 3-K) e DEO (Figura 3-L). E as comparações da expressão de SUFU entre DEO, MNN, hiperqueratose e HFI estão descritas na tabela 12 e representadas na figura 5.

Tabela 8. Expressão da proteína SUFU em DEO.

	SUFU		Mediana	Valor de p
	Positivo n (%)	Negativo n (%)		
<u>Sexo*</u>				
Feminino	7 (58,33)	5 (41,67)	118.5	0.18
Masculino	4 (36,36)	7 (63,64)	0.0	
<u>Sítio anatômico**</u>				
Mucosa jugal	6 (75)	2 (25)	232.0	0.20
Língua	1 (20)	4 (80)	0.0	
Palato	1 (25)	3 (75)	0.0	
Gengiva	1 (33,33)	2 (66,67)	0.0	
Assoalho bucal	2 (100)	0(0)	220.5	
<u>Grau histológico</u>				
Discreta	9 (42,86)	12 (57,14)	0.0	-
Moderada	0 (0)	2 (100)	0.0	
Intensa	2 (100)	0 (0)	839.0	
<u>Risco de malignidade*</u>				
Baixo risco	9 (42,86)	12 (57,14)	0.0	0.47
Alto risco	2 (50)	2 (50)	176.5	

Nota: *Teste de Mann-Whitney; **Teste de Kruskal-Wallis.

5.2.4 HHIP

A expressão da proteína HHIP foi observada em membrana e citoplasma de células epiteliais, além de uma imunomarcção perinuclear. Dezesete (68%) casos de DEO foram positivos, sendo que 10 (58,82%) apresentaram escore 3+, 4 (23,53%) escore 1+ e 3 (17,65%) escore 2+. A análise descritiva relacionada a imunoexpressão desta proteína para os sexos, localização anatômica, grau histológico e risco de malignidade está representado na tabela 9.

As amostras de mucosa bucal não neoplásica e de hiperqueratose foram todas negativas para HHIP, enquanto dois casos de HFI exibiram marcação citoplasmática de escores 1+. A figura 4 mostra a imunomarcção de HHIP em MNN (Figura 4-A), HFI (Figura 4-B), hiperqueratose (Figura 4-C) e DEO (Figura 4-D). E as comparações da expressão de HHIP entre DEO, MNN, hiperqueratose e HFI estão descritas na tabela 12 e representadas na figura 5.

Tabela 9. Expressão da proteína HHIP em DEO.

	HHIP		Mediana	Valor de p
	Positivo n (%)	Negativo n (%)		
<u>Sexo*</u>				
Feminino	7 (58,33)	5 (41,67)	286.5	0.45
Masculino	8 (71,73)	3 (27,27)	276.0	
<u>Sítio anatômico**</u>				
Mucosa jugal	5 (62,5)	3 (37,5)	166.5	0.64
Língua	4 (80)	1 (20)	292.0	
Palato	2 (50)	2 (50)	146.0	
Gengiva	3 (100)	0 (0)	442.0	
Assoalho bucal	0 (0)	2 (100)	0.0	
<u>Grau histológico**</u>				
Discreta	15 (71,43)	6 (28,57)	292.0	-
Moderada	2 (100)	0 (0)	203.5	
Intensa	0 (0)	2 (100)	0.0	
<u>Risco de malignidade*</u>				
Baixo risco	15 (71,43)	6 (28,57)	292.0	0.27
Alto risco	2 (50)	2 (50)	39.0	

Nota: *Teste de Mann-Whitney; **Teste de Kruskal-Wallis.

5.2.5 GLI1

A proteína GLI1 foi positiva em 21 (84%) casos de DEO, predominando o escore 3+ (n=19; 90,48%). Os outros 2 (9,52%) casos tiveram escore 2+. Quanto a localização, GLI1 foi observada em núcleo apenas 4 (19,05%) e 17 (80,95%) no núcleo e citoplasma, em todas as camadas do compartimento epitelial. A análise descritiva da imunexpressão desta proteína para sexo, localização anatômica, grau histológico e risco de malignidade está representado na tabela 10.

Um caso de mucosa bucal não neoplásica e um de hiperqueratose exibiram positividade para GLI1, em citoplasma e escore 1+. Todos os casos de HFI foram negativos. A figura 4 mostra a imunomarcagem de GLI1 em MNN (Figura 4-E), HFI (Figura 4-F), hiperqueratose (Figura 4-G) e DEO (Figura 4-H). E as comparações da expressão de GLI1 entre DEO, MNN, hiperqueratose e HFI estão descritas na tabela 12 e representadas na figura 5.

Tabela 10. Expressão da proteína GLI1 em DEO.

	GLI1		Mediana	Valor de p
	Positivo n (%)	Negativo n (%)		
<u>Sexo*</u>				
Feminino	10 (83,33)	2 (16,67)	453.0	0.60
Masculino	9 (81,82)	2 (18,18)	528.0	
<u>Sítio anatômico**</u>				
Mucosa jugal	7 (87,5)	2 (12,5)	341.0	0.70
Língua	3 (60)	2 (40)	476.0	
Palato	3 (75)	1 (25)	480.0	
Gengiva	3 (100)	0 (0)	720.0	
Assoalho bucal	2 (100)	0(0)	364.0	
<u>Grau histológico</u>				
Discreta	17 (80,95)	4 (19,05)	456.0	-
Moderada	2 (100)	0 (0)	590.5	
Intensa	2 (100)	0 (0)	402.0	
<u>Risco de malignidade*</u>				
Baixo risco	17 (80,95)	4 (19,05)	456.0	0.62
Alto risco	4 (100)	0 (0)	536.0	

Nota: *Teste de Mann-Whitney; **Teste de Kruskal-Wallis.

5.2.6 CCND1

Dezenove (76%) casos de DEO foram positivos para a proteína CCND1 sendo que 9 (47,37%) apresentaram uma imunomarcacão com escore 1+, 6 (31,58%) escore 2+ e 4 (21,05%) escore 3+, exclusivamente no núcleo de células do compartimento epitelial. Todos os casos de DEO classificados como alto risco foram positivos para esta proteína, enquanto que no grupo DEO de baixo risco, 15 (42,86%) amostras exibiram imunomarcacão. Na tabela 11 é possível visualizar a análise descritiva da imunoexpressão desta proteína para sexo, localizacão anatômica, grau histológico e risco de malignidade.

As amostras de mucosa bucal normal foram negativas para a imunomarcacão de CCND1, enquanto em 4 (80%) e 2 (25%) hiperqueratoses e HFI foram positivas e ambas apresentaram escore 1+ e localizacão nuclear nas células epiteliais nas camadas basal e suprabasal. A figura 4 mostra a imunomarcacão de CCND1 em MNN (Figura 4-I), HFI (Figura 4-J), hiperqueratose (Figura 4-K) e DEO (Figura 4-L). E as comparações da expressão de CCND1 entre DEO, MNN, hiperqueratose e HFI estão descritas na tabela 12 e representadas na figura 5.

Tabela 11. Expressão da proteína CCND1 em DEO.

	CCND1		Mediana	Valor de p
	Positivo n (%)	Negativo n (%)		
<u>Sexo*</u>				
Feminino	8 (66,67)	4 (33,33)	137.0	0.05
Masculino	10 (90,91)	1 (9,09)	374.0	
<u>Sítio anatômico**</u>				
Mucosa jugal	7 (87,5)	1 (12,5)	233.0	0.58
Língua	4 (80)	1 (20)	352.0	
Palato	2 (50)	2 (50)	21.5	
Gengiva	2 (66,67)	1 (33,33)	803.0	
Assoalho bucal	2 (100)	0(0)	536.0	
<u>Grau histológico</u>				
Discreta	15 (71,43)	6 (28,57)	190.0	-
Moderada	2 (100)	0(0)	325.5	
Intensa	2 (100)	0 (0)	811.0	
<u>Risco de malignidade*</u>				
Baixo risco	15 (42,86)	6 (28,57)	190.0	0.19
Alto risco	4 (100)	0 (0)	557.0	

Nota: *Teste de Mann-Whitney; **Teste de Kruskal-Wallis.

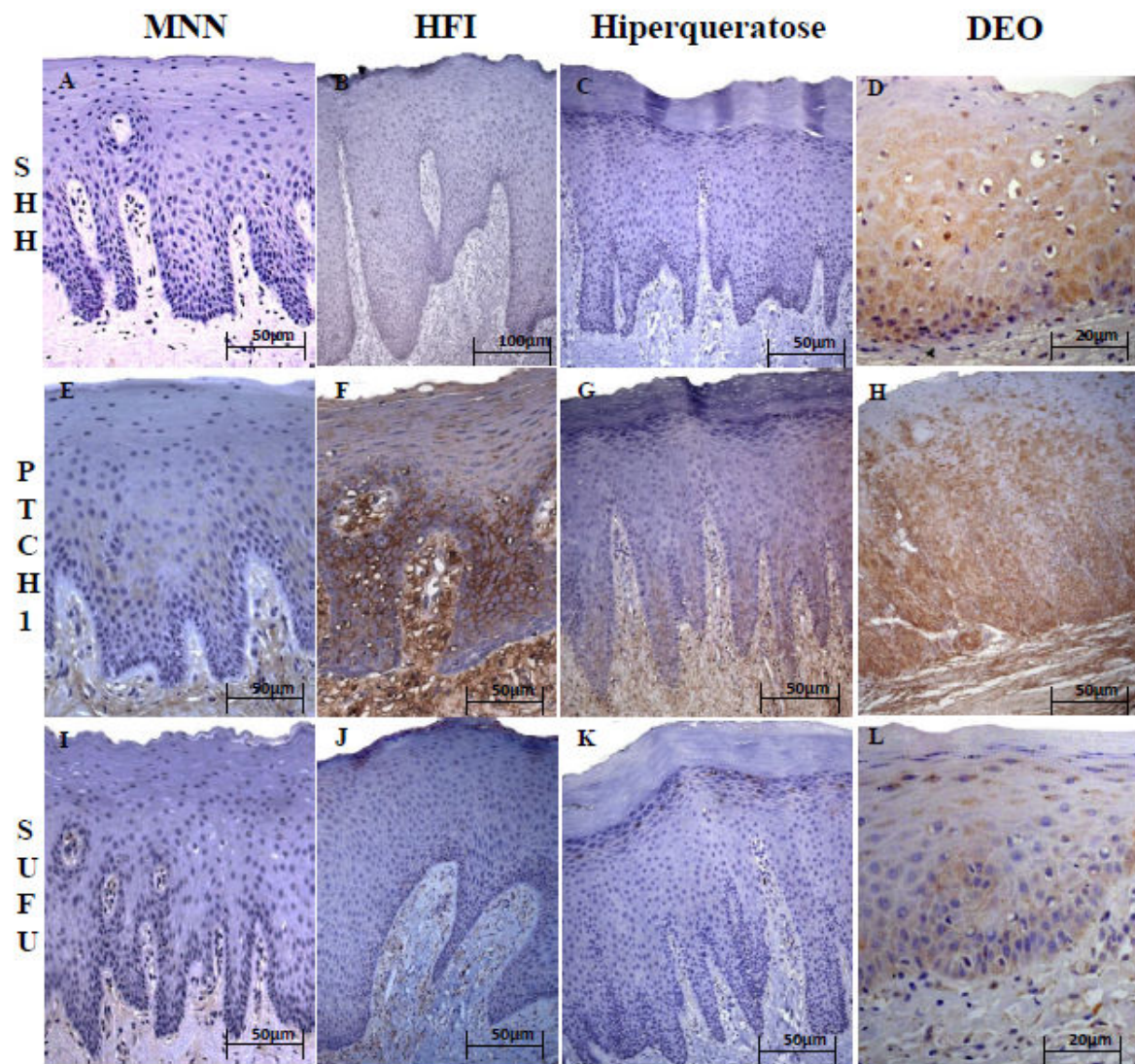


Figura 2: (A-D)-SHH: (A-C) Escore negativo para Mucosa não-neoplásica (MNN), Hiperplasia Fibrosa Inflamatória (HFI) e Hiperqueratose. (D) Displasia epitelial oral (DEO) discreta/baixo risco exibindo escore 3+. (E-H)-PTCH1: (E-G). Imunomarcção discreta e membranar em MNN e Hiperqueratose. (F) Imunomarcção membranar intensa em HFI. (H) Predomínio do padrão membranar em DEO intensa/alto risco. (I-L)-SUFU: (I-K) Células epiteliais negativas em MNN, HFI e Hiperqueratose. (L) DEO discreta/baixo risco exibindo marcação citoplasmática de escore 2+.

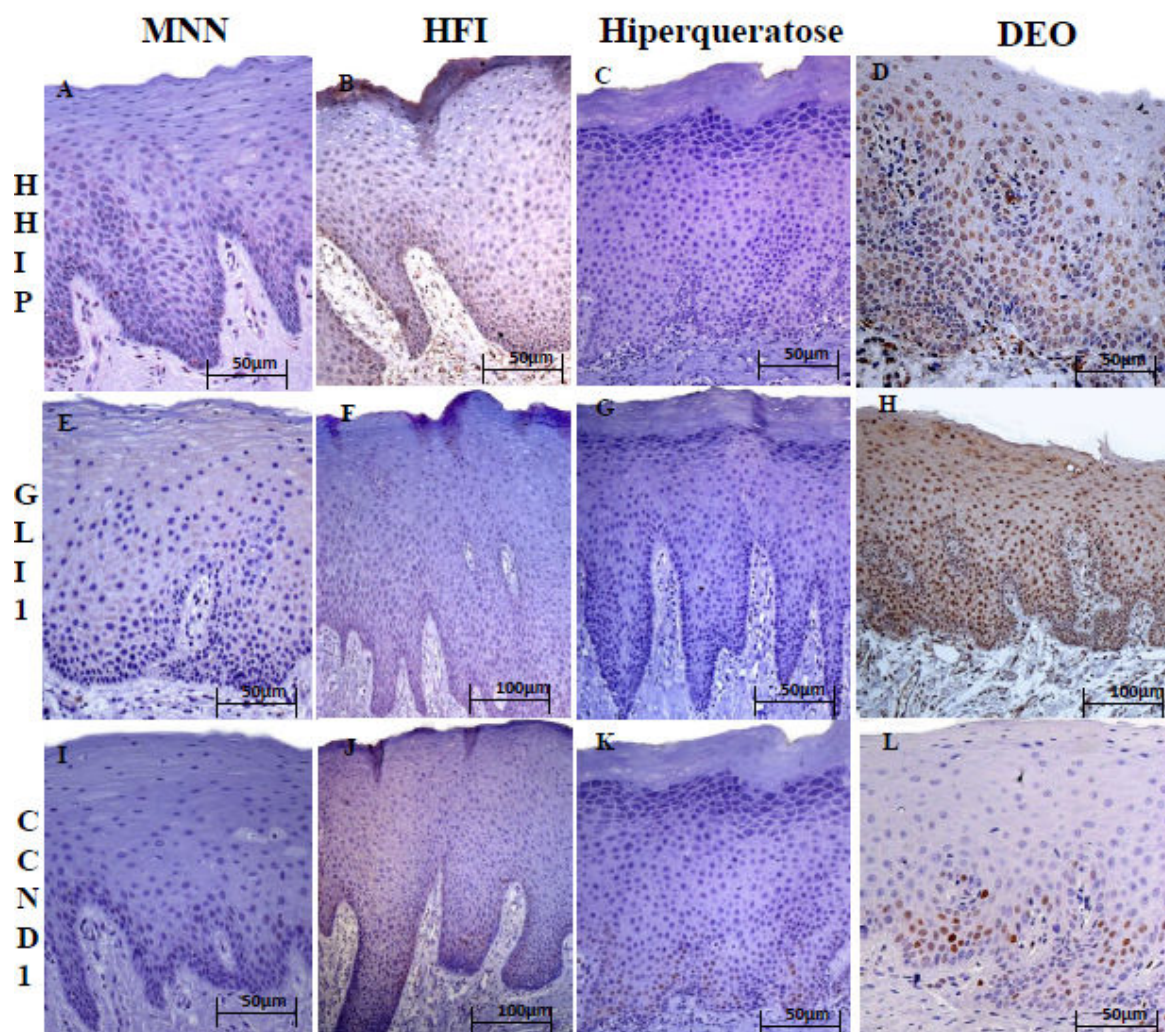


Figura 4: (A-D)-HHIP: (A-C) Células epiteliais negativas em Mucosa não-neoplásica (MNN), Hiperplasia Fibrosa Inflamatória (HFI) e Hiperqueratose. (D) Imunomarcção citoplasmática e perinuclear em Displasia epitelial oral (DEO) discreta/baixo risco exibindo escore 3+. **(E-H)- GLI1:** (E-G). Escore negativo para MNN, HFI e Hiperqueratose. (H) Predomínio do padrão nuclear em DEO discreta/baixo risco exibindo escore 3+. **(I-L)-CCND1:** (I e J) Escore negativo em MNN e HFI. (K e L) Imunomarcção nuclear em Hiperqueratose e DEO discreta/baixo risco exibindo escore 1+.

A análise descritiva da imunexpressão das proteínas da via SHH analisadas e as respectivas comparações entre DEO, MNN, hiperqueratose e HFI estão descritas na tabela 12 e representadas na figura 5. Os escores detalhados de imunomarcção das DEO, MNN, hiperqueratose e HFI podem ser observados na tabela 1 (ANEXO).

Tabela 12. Comparação da expressão das proteínas da via SHH entre DEO e MNN, hiperqueratose e HFI.

	Displasia epitelial oral		MNN			Hiperqueratose			Hiperplasia fibrosa inflamatória		
	n (%)	Mediana	n (%)	Mediana	p	n (%)	Mediana	p	n (%)	Mediana	p
SHH											
Positivo	14 (56)		4 (100)			1 (20)			0 (0)		
Negativo	11 (44)	155.0	0 (0)	0.0	-*	4 (80)	0.0	0.13	8 (100)	0.0	-*
PTCH1											
Positivo	23 (92)		0 (0)			5 (100)			5 (62,5)		
Negativo	2 (8)	374.0	4 (100)	150.0	0.01	0 (0)	113.0	0.57	3 (37,5)	113.0	0.05
HHIP											
Positivo	19 (76)		4 (100)			0 (0)			2 (25)		
Negativo	6 (24)	281.0	0 (0)	0.0	-*	5 (100)	0.0	0.02	6 (75)	0.0	0.01
SUFU											
Positivo	11 (44)		4 (100)			1 (20)			1 (12,5)		
Negativo	14 (56)	0.0	0 (0)	0.0	-*	4 (80)	0.0	0.30	7 (87,5)	0.0	-*
GLI1											
Positivo	21 (84)		3 (75)			1 (20)			-		
Negativo	4 (16)	476.0	1 (25)	37.5 (citoplasma)	-**	4 (80)	0.0	0.00	8 (100)	0.0	-*
Ciclina D1											
Positivo	17 (68)		4 (100)			4 (80)			3 (37,5)		
Negativo	8 (32)	276.0	0 (0)	0.0	-*	1 (20)	0.0	0.15	5 (62,5)	0.0	0.00

Nota: Para a análise estatística foi utilizado o valor de mediana para expressão das proteínas da via SHH (Teste de Mann Whitney). * Não foi possível aplicar testes estatísticos quando um dos grupos (HFI e/ou MNN)

teve todos os valores de imunomarcação igual a ZERO. ** Não comparado, uma vez que GLI1 em MNN foi detectada em citoplasma.

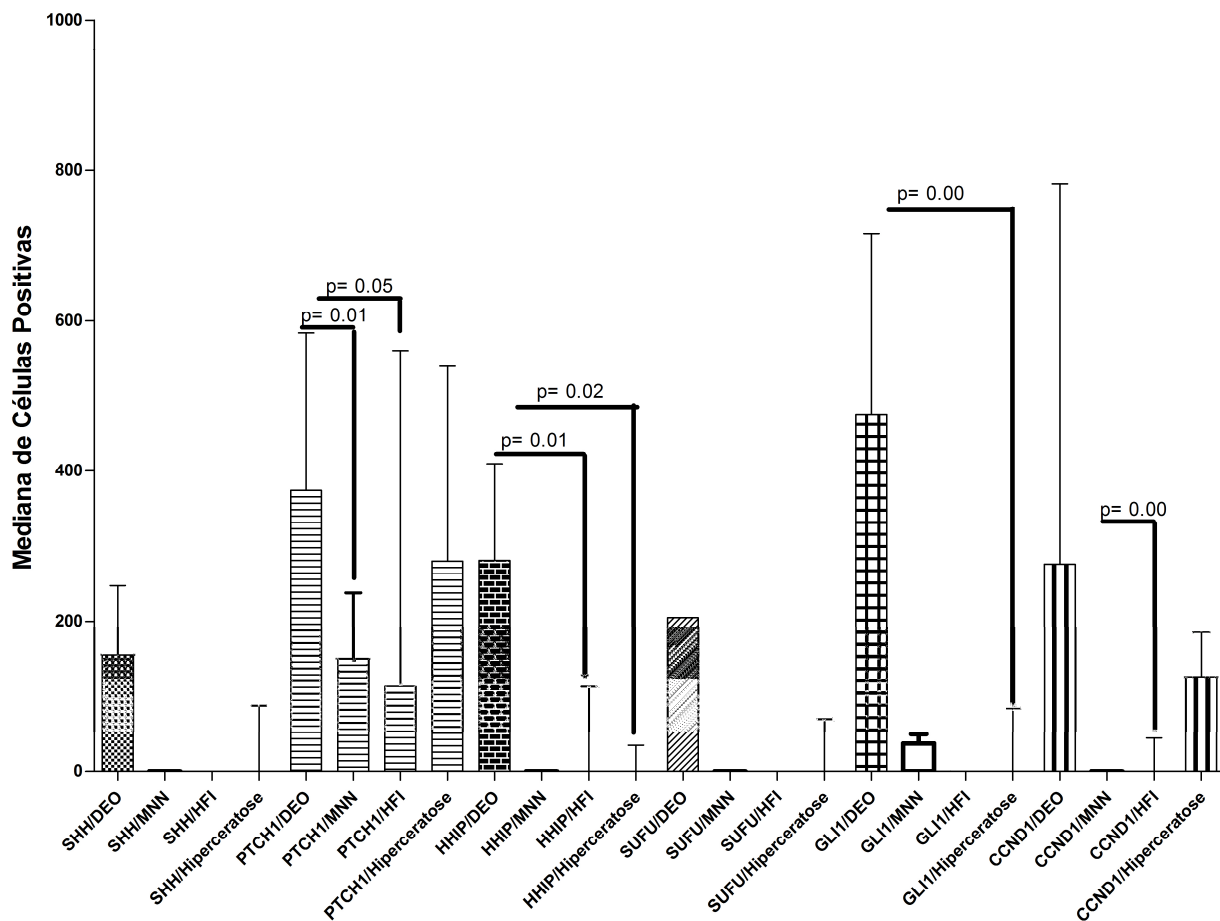


Figura 5. Expressão das proteínas da via SHH entre os grupos displasia epitelial oral, mucosa não-neoplásica, hiperplasia fibrosa inflamatória e hiperqueratose.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, comparamos a expressão de proteínas da via SHH em 25 casos de DEO, com tecidos histologicamente normais de 4 MNN e com lesões reativas (5 hiperqueratoses e 8 HFI) da mucosa bucal. Cabe ressaltar que todos os casos de DEO de lábio inferior foram excluídos da casuística (a qual inicialmente era de 37 DEO), uma vez que a radiação solar é o fator intrinsecamente relacionado ao aparecimento desta lesão (GANDINI et al., 2005; EL GHISSASSI et al., 2009), e as características clínicas e histológicas do câncer de lábio são mais semelhantes aos do câncer de pele (SOUZA et al., 2011).

Neste estudo, as DEO foram graduadas segundo a OMS (2005) e risco de transformação maligna (KUJAN et al., 2006). Apesar de ainda não existir um sistema de classificação histológico que possa prever com acurácia o que determina a progressão de uma DEO para CEB, os patologistas concordam que o sistema binário proposto por Kujan et al. (2006) é um melhor indicador de prognóstico quanto ao risco de transformação maligna (WARNAKULASURIYA et al., 2008; NANKIVELL et al., 2013). A alta prevalência de DEO discreta é comum na maioria dos estudos e acredita-se que o diagnóstico precoce associado com a suspensão do fator etiológico faz com que não haja uma progressão da lesão para o grau moderado ou intenso da displasia ou até mesmo na regressão da doença (REIBEL, 2003). Com este resultado, observamos que houve concordância entre a classificação da OMS (2005) e o sistema binário (KUJAN et al., 2006) para os casos de DEO do presente estudo.

Vias de sinalização que participam do desenvolvimento embrionário são normalmente mantidas em estado inativo em tecidos não-neoplásicos adultos e a reativação destas pode resultar em desenvolvimento tumoral (ALTABA et al., 2002;

CHARI et al., 2007). Evidências recentes apontam que a via SHH parece ter uma participação importante na patogênese do CEB (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL, 2011; LEOVIC et al. 2011; SCHNEIDER et al., 2011; HANOMI et al., 2011), mas não é de nosso conhecimento nenhum trabalho que estude a cascata sinalizadora SHH em LPM de boca.

Os resultados desse estudo demonstraram que a via SHH está ativada em DEO, ou seja, em um estágio anterior ao desenvolvimento do câncer e, dessa forma, proteínas dessa via de sinalização, estão possivelmente relacionadas a etapas iniciais da carcinogênese e são possíveis candidatos a biomarcadores desta doença.

Quando ativada, a via de sinalização SHH desempenha um papel importante na transcrição de genes relacionados a proliferação e diferenciação celular, por exemplo Ciclina D1 e β -catenina, (KATOH et al., 2009) e a participação desta via em tumores malignos como hepatocarcinoma (SICKLICK et al., 2006; PATIL et al., 2006; HUANG et al., 2006; CHE et al., 2012), pâncreas (THAYER et al., 2003; MORTON et al., 2007) e carcinoma basocelular (GORLIN, 1995; HAHN et al., 1996; JOHNSON et al., 1996; REIFENBERGER et al., 1998; XIE et al., 1998) já está bem estabelecida. Em lesões precursoras de colón (ONISCU et al., 2004), colo uterino (XUAN et al., 2006) e pâncreas (THAYER et al., 2003) também há evidência da participação das moléculas da via SHH.

A via SHH pode ser re-ativada através de mecanismos diversos, com ou sem participação do ligante SHH, através de ativação mutacional de SMO e mutação de PTCH1 (WALTERHOUSE et al., 1999). Ao mesmo tempo, no ambiente tumoral, pode ocorrer tanto sinalização parácrina quanto autócrina (THAYER et al., 2003; NISHIMAKI et al., 2004; YAUCH et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2010; LEOVIC et

al., 2011; HANOMI et al., 2011). A presença do morfógeno SHH exclusivamente no citoplasma de células epiteliais do terço médio em 14 (56%) casos de DEO demonstra que o ligante pode ter participação na ativação autócrina da via SHH nesta doença. Em outras lesões precursoras, como em colón e colo uterino, essa proteína também foi detectada no citoplasma e sua expressão foi significativamente maior do que nos tecidos não neoplásico (ONISCU et al., 2004; XUAN et al., 2006).

De fato, a participação do morfógeno SHH na patogênese do CEB é ainda controversa. Enquanto alguns autores não conseguiram detectar expressão desta molécula (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011) em CEB, outros detectaram uma baixa expressão da mesma, nesta doença (LEOVIC et al., 2012). Por outro lado, nas amostras de MNN não houve expressão da proteína SHH, corroborando com outros autores (CUI et al., 2010; Li et al., 2012; WANG et al., 2012). Em HFI também não houve nenhum caso com marcação positiva para esta proteína, enquanto que no grupo das hiperqueratoses, uma amostra apresentou escore 1+. Esses resultados apontam que a inflamação, em lesões de cavidade oral, parece não interferir na expressão do ligante SHH, como visto, por exemplo, em outras processos crônicos reacionais como cirrose hepática (CHOI et al., 2009), fibrose biliar (OMENETTI et al., 2008) e fibrose pulmonar crônica (STEWART et al., 2003). Dessa forma, é preciso analisar se a expressão da proteína SHH está relacionada com danos genéticos não-letais iniciais do processo de carcinogênese ou até mesmo ao agente agressor, como os hidrocarbonetos policíclicos encontrados no fumo.

No presente estudo, a proteína PTCH1 foi observada na membrana de células epiteliais e da lâmina própria em todos os grupos, desde as DEO até as MNN, sendo que no grupo das LPM, a imunomarcação foi mais intensa e envolveu um maior número de células. A expressão constitutiva da proteína PTCH1 já é esperada em tecidos adultos,

já que ela atua como supressora tumoral (SICKLICK et al., 2006) e reguladora negativa da via SHH (CHARI et al., 2007; CHEN et al., 2007). Se por um lado, é esperada uma baixa expressão desta proteína em tecidos não neoplásicos (ONISCU et al., 2004; XUAN et al., 2006), por outro, a superexpressão de PTCH1 é um evento comum em neoplasias malignas (YOSHIKAWA et al., 2009; CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011; CHE et al., 2012). Isso por que, o gene PTCH1 é alvo dos fatores de transcrição da via SHH e detecção de altos níveis desta proteína indica atividade dessa via de sinalização (XIE et al., 1998; WETMORE, 2003).

De forma semelhante, um aumento de expressão de SUFU e HHIP também é esperado quando da ativação da via SHH. Ambas proteínas desempenham papel de supressoras tumoral e são codificadas por genes alvos desta cascata (CHARI et al., 2007; CHEN et al., 2007). Enquanto 68% (n=17) e 44% (n=11) das amostras de DEO, exibiram positividade para HHIP e SUFU, respectivamente, todas as amostras de MNN foram negativas para ambas proteínas. Já com relação as amostras de lesões reativas, dois casos de HFI e um de hiperqueratose foram positivos. A superexpressão de HHIP tem sido associada a uma tentativa de controle da atividade da via SHH em alguns tumores humanos (KATOH et al., 2005). Ao mesmo tempo que a detecção de PTCH1, HHIP e SUFU corrobora para a atividade da via SHH em DEO, essas proteínas podem também suprimir os eventos de malignização, os quais são realmente pouco frequente (KATOH et al., 2006; SONG et al., 2013).

Dentre todos os resultados pioneiros gerados com esse trabalho, demonstrar marcação nuclear de GLI1 em 70,58% dos casos de DEO ratifica a participação da via SHH em DEO, já que a translocação nuclear da proteína GLI1 ocorre somente após a ativação desta cascata (TEN HAAF et al., 2009; SOUZAKI et al., 2011). Em nenhum caso de MNN, hiperqueratose e HFI esse padrão de imunomarcação foi observado.

Como a expressão nuclear de GLI1 está relacionada a um prognóstico mais desfavorável em vários tipos de tumores malignos (FELDMANN et al., 2007; ISOHATA et al., 2009; SOUZAKI et al., 2011), é preciso avaliar se GLI1 poderia ser um biomarcador em DEO, em uma casuística maior e representativa desta doença na população.

Apesar dos níveis de CCND1 poder ser regulado por diversos mecanismos (GILLET et al., 1994; RUSSEL et al., 1999), um dos efeitos da detecção de GLI1 nuclear é a superexpressão da CCND1 (LI et al., 2010; FIASCHI et al., 2011; BERMUDEZ et al., 2013). Altos níveis de CCND1 resultam na perda de controle do ciclo celular e hiperproliferação, o que pode estar associado com a iniciação e desenvolvimento tumoral (SHERR 1995; HANKEN et al., 2014). Outros estudos já demonstraram a presença de CCND1 em DEO (TURATTI et al., 2005; KOVESI et al., 2006; RAMASUBRAMANIAN et al., 2013).

É interessante notar que a detecção desta proteína é descrita tanto na camada basal, quanto em camadas supra-basais (KOVESI et al., 2006; RAMASUBRAMANIAN et al., 2013), em acordo com os nossos resultados, demonstrando que essas lesões exibem um compartimento proliferativo supra-basal. Por outro lado, as amostras de MNN foram consideradas negativas, por apresentarem < 5% de células imunomarcadas para esta proteína, concordando com outros autores que também utilizaram MNN para fins comparativos (TURATTI et al., 2005; KOVESI et al., 2006). No grupo das hiperqueratoses e HFI, 4 (80%) e 2 (25%) dos casos foram positivos em células do compartimento basal e para-basal. Entretanto, nesses casos, é preciso considerar um possível efeito do processo inflamatório na expressão de CCND1, conforme já demonstrado por Nair et al, 2013.

Entre lesões de alto e baixo risco de malignização, não foi possível detectar diferenças qualitativas e estatísticas no padrão de expressão das proteínas da via SHH, apesar de uma tendência de maior expressão de HHIP em lesões de baixo risco. Apesar de todos os casos de DEO de alto risco terem sido positivos para CCND1, enquanto que no grupo DEO de baixo risco esta proteína ter sido identificada em parte da amostra, é impossível desconsiderar o efeito do acaso, uma vez que o grupo de DEO de alto risco teve apenas um n amostra de 4 DEO. Em outros estudos com CEB (WANG et al., 2012) e mama (CUI et al., 2010) a gradação histológica também não foi um fator preponderante na distribuição da imunomarcação das proteínas SHH, PTCH1 e GLI1.

Os resultados comparativos entre DEO, MNN, hiperqueratose e HFI sugerem a participação da via SHH na patogênese das DEO. Especialmente quando comparadas com a HFI, as DEO mostraram maiores níveis de expressão de todas as moléculas desta via, corroborando para a participação dessas proteínas na carcinogênese, independente de processo inflamatório.

Nessa casuística, a idade dos pacientes com DEO variou de 25 a 83 anos, apresentando uma média de 57,14 (DP=17,45), corroborando com outros autores que encontraram a 6ª década de vida como a faixa etária de maior prevalência (LEE et al., 2006; ARDUINO et al., 2009). Não houve predileção quanto ao sexo (HO et al., 2012 e NANKIVELL et al., 2013) e os sítios anatômicos acometidos nessa casuística foram locais comumente descritos em outros estudos (LEE et al., 2006; JABER, 2010; HO et al., 2012). Clinicamente, o diagnóstico inicial das DEO foi leucoplasia na maioria dos indivíduos (68%), sendo este o aspecto predominante para as lesões com DEO (LIU et al., 2011; NANKIVELL et al., 2013), enquanto que o aspecto eritroplásico é pouco descrito (HOLMSTRUP et al. 2006; JABER, 2010; LIU et al., 2011; HO et al., 2012; NANKIVELL et al., 2013).

Por fim, este estudo apresenta resultados importantes que sugerem a participação da via SHH em DEO, além de demonstrar consistentemente que esta cascata sinalizadora encontra-se re-ativada nestas lesões. Para compreender melhor se moléculas da via, como a proteína GLI1, poderia ser um biomarcador para esta condição patológica, é preciso ampliar o estudo com uma casuística representativa desta doença, além de preservar efetivamente os pacientes de forma a identificar os casos de DEO que realmente evoluem para CEB. Alternativamente, avaliar a expressão de genes e proteínas da via SHH em diferentes etapas da carcinogênese, em modelo experimental de CEB, poderia ser uma estratégia valiosa para entender a participação dessas moléculas na patogênese tumoral. Considerando-se que já existem substâncias químicas e medicamentos (Ex: GANT61, GANT58, Ciclopamina, Itraconazol e hormônios esteróides) sendo testados em ensaios clínicos para outros tumores (Ex: Carcinoma basocelular e câncer de pâncreas) (LAUTH et al., 2007; YAN et al., 2011; DEL CARRATORE et al., 2012; CONI et al., 2013; HOU et al., 2014), o bloqueio da via em uma etapa preliminar poderia ser uma estratégia valiosa para prevenir a progressão de DEO.

7 CONCLUSÃO

- Todas as proteínas avaliadas da via SHH foram positivas em DEO, indicando a participação desta cascata sinalizadora na patogênese destas lesões. Ao mesmo tempo, os resultados obtidos com a proteína SHH, indicam que a ativação da via pode ser por mecanismos autócrinos dependentes ou não deste ligante. Já os resultados para CCND1 indicam a presença de um compartimento proliferativo suprabasal em DEO.
- Os resultados encontrados para MNN, hiperqueratose e HFI, quando comparados com DEO, reforçam a participação da via SHH na carcinogênese. Ao mesmo tempo, a inflamação presente em todos os casos de HFI não pareceu interferir nos níveis de expressão de SHH, PTCH1, HHIP e GLI1.
- Não foi possível estabelecer uma relação entre a expressão das proteínas da via SHH, classificação de risco de transformação maligna e gradação histológica de malignidade.

REFERÊNCIAS

- ALTABA, A.R.; SÁNCHEZ, P.; DAHMANE, N. Gli and Hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. **Nature**, v. 2, n. 5, p. 361-362, 2002.
- ALTABA, RA. Therapeutic inhibition of Hedgehog GLI signaling in cancer: epithelial, stromal or stem cell targets? **Cancer Cell**, v. 14, n. 4, p. 281-283, 2008.
- ARDUINO, P.G. et al. Outcome of oral dysplasia: a retrospective hospital-based study of 207 patients with a long follow-up. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 38, p. 540-544, 2009.
- ASAI, J. et al. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. **Circulation**, v. 113, n. 20, p. 2413-2424, 2006.
- BERMAN, D.M. et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumors. **Nature**, v. 425, p. 846-851, 2003.
- BERMUDEZ, O. et al. Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, e. 63226, 2013.
- BOUQUOT, J.E.; SPEIGHT, P.M.; FARTHING, P.M. Epithelial dysplasia of the oral mucosa -Diagnostic problems and prognostic features. **Current Diagnostic Pathology**, v. 12, p. 11-21, 2006.
- BOYLE, J.O. et al. The Incidence of *p53* Mutations Increases with Progression of Head and Neck Cancer. **Cancer Research**, v. 53, n.19, p. 4477-4480, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br>. Acesso em: 3 jan. 2014.
- BRENNAN, J.A. et al. Association between cigarette smoking and mutation of the *p53* gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 11, p. 712-717, 1995.
- CAVICCHIOLI BUIM, M.E. et al. Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **Human Pathology**, v. 42, n. 10, p. 1484-1490, 2011.
- CHARI, N.S.; MCDONNELL, T.J. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 14, n. 5, p. 344-352. 2007.

CHE, L.; YUAN, Y.H.; JIA, J. Activation of Sonic Hedgehog signaling pathway is an independent potential prognosis predictor in human hepatocellular carcinoma patients. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 24, n. 4, p. 323-331, 2012.

CHEN, X. et al. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis. **Cancer Science**, v. 98, p. 68-76, 2007.

CHOI, S.S. et al. Hedgehog pathway activation and epithelial-to-mesenchymal transitions during myofibroblastic transformation of rat hepatic cells in culture and cirrhosis. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 297, p. 1093–1106, 2009.

CONI, S.; INFANTE, P.; GULINO, A. Control of stem cells and cancer stem cells by Hedgehog signaling: Pharmacologic clues from pathway dissection. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, p. 623–628, 2013.

CRUZ, I. et al. Suprabasal p53 immunoreactivity is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 2, p. 98-104, 2002.

CRUZ, I.B. et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 184, n. 4, p. 360-368, 1998.

CUI, W. et al. Expression and regulation mechanisms of Sonic Hedgehog in breast cancer. **Cancer Science**, v. 101, n. 4, 927-933, 2010.

DEL CARRATORE, R. et al. Itraconazole inhibits HMEC-1 angiogenesis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 66, n. 4, p. 312-317, 2012.

DIMMLER, A. et al. Transcription of sonic hedgehog, a potential factor for gastric morphogenesis and gastric mucosa maintenance, is upregulated in acidic conditions. **Laboratory Investigation**, v. 83, p. 1829-1837, 2003.

EL GHISSASSI, F. et al. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens – part D: radiation. **Lancet Oncology**, v. 10, n. 8, p. 751–752, 2009.

FELDMANN, G. et al. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. **Cancer Research**, v. 67, p. 2187-2196, 2007.

FIASCHI, M. et al. Targeted expression of GLI1 in the salivary glands results in an altered differentiation program and hyperplasia. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 5, p. 2569-2579, 2011.

GALE, N. et al. Tumours of the hypopharynx, larynx and trachea (Epithelial precursor lesions). In: BARNES, L. et al. **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Head and neck tumours.** International Agency for Research on Cancer (IARC) IARC Press. 2005. p. 140-143.

GANDINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 1, p. 45–60, 2005.

GILLETT, C. et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. **Cancer Research**, v. 54, n. 7, p. 1812-1817, 1994.

GOODRICH, L.V. et al. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. **Science**, v. 277, p. 1109-1113, 1997.

GORLIN, R.J. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Dermatology Clinic**, v. 13, n. 1, p.113-125. 1995.

GRINDLEY, J.C. et al. Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. **Developmental Biology**, v. 188, n. 2, 337-348, 1997.

GURGEL, C.A. et al. Expression of Ki-67, p53 and p63 proteins in keratocyst odontogenic tumours: an immunohistochemical study. **Journal of Molecular Histology**, v. 39, n. 3, p. 311-316, 2008.

HAHN, H. et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Cell**, v. 85, p. 841-851, 1996.

HAHN, H. et al. The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models. **Journal of Molecular Medicine**, v. 77, n. 6, 459-468, 1999.

HANKEN, H. et al. CCND1 amplification and cyclin D1 immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinomas. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 1, p. 269-276, 2014.

HARDCASTLE, Z. et al. The Shh signaling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. **Development**, v. 125, p. 2803-2811, 1998.

HASSOUNAH, N.B.; BUNCH, T.A.; MCDERMOTT, K.M. Molecular Pathways: The Role of Primary Cilia in Cancer Progression and Therapeutics with a Focus on Hedgehog Signaling. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 9, p. 2429–2435, 2012.

HELAL, T.E.A. et al. Immunoexpression of p53 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma and oral dysplastic lesions in Yemen: Relationship to oral risk habits and prognostic factors. **Oral Oncology**, v. 48, n. 2, p. 120-124, 2011.

HO, M.W. et al. The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. **Oral Oncology**, v. 48, p. 969-976, 2012.

HOLMSTUP, P. et al. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncology**, v. 42, p. 461-474, 2006.

HONAMI, T. et al. Sonic hedgehog signaling promotes growth of oral squamous cell carcinoma cells associated with bone destruction. **Oral Oncology**, v. 48, n. 1, p. 49-55, 2011.

HOOPER, J.E.; SCOTT, M.P. Communicating with Hedgehogs. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 306–317, 2005.

HOU, X. et al. Inhibition of hedgehog signaling by GANT58 induces apoptosis and shows synergistic antitumor activity with AKT inhibitor in acute T cell leukemia cells. **Biochimie**, Jan 2014 . [Epub ahead of print]

HUANG, S. et al. Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 1334-1340, 2006.

HUMKE, E.W. et al. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. **Genes and Development**, v. 24, p. 670–682, 2010.

INGHAM, P.W.; MCMAHON, A.P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes and Development**, v. 15, n. 23, p. 3059-3087, 2001.

ISOHATA, N. et al. Hedgehog and epithelial-mesenchymal transition signaling in normal and malignant epithelial cells of the esophagus. **International Journal of Cancer**, v. 125, p. 1212-1221, 2009.

JABER, M.A. et al. Oral epithelial dysplasia: clinical characteristics of western European residents. **Oral Oncology**, v. 39, n. 6, p. 589-596, 2003.

JABER, M.A. Oral epithelial dysplasia in non-users of tobacco and alcohol: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcome. **Journal of Oral Science**, v. 52, n. 1, p. 13-21, 2010.

JEMAL, A. et al. Global Cancer Statistics. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 69–90, 2011.

JOHNSON, R.L. et al. Human homolog of Patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. **Science**, v. 272, p. 1668-1671, 1996.

KARHADKAR, S.S. et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. **Nature**, v. 431, p. 707-712, 2004.

KATANO, M. Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. **Cancer Letters**, v. 227, p. 99–104, 2005.

KATO, J. et al. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. **Genes and Development**, v. 7, n. 3, p. 331-342, 1993.

KATOH, Y.; KATOH, M. Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review). **Internacional Journal of Molecular Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1019-1023, 2006.

KATOH, Y.; KATOH, M. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. **Cancer Biology and Therapy**, v. 4, n. 10, p. 1050-1054, 2005.

KATOH, Y.; KATOH, M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. **Current Molecular Medicine**, v. 9, n. 7, p. 873-886, 2009.

KAWAKITA, D.; HOSONO, S.; ITO, H. Impact of smoking status on clinical outcome in oral cavity cancer patients. **Oral Oncology**, v. 48, n. 2, p. 186-191, 2012.

KIM, J.; DABIRI, S.; SEELEY, E.S. Primary cilium depletion typifies cutaneous melanoma in situ and malignant melanoma. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, e27410, 2011.

KOVESI, G.; SZENDE, B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral Leukoplakia. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 35, p. 274–277, 2006.

KUBO, M. et al. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. **Cancer Research**, v. 64, p. 6071-6074, 2004.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, v. 42, n. 10, p. 987-993, 2006.

LAUTH, M. et al. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 8455–8460, 2007.

LEE, J.J. et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 5, p. 1702-1710, 2000.

LEE, J.J. et al. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: Prevalence and risk factors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 101, n. 4, p. 472-480, 2006.

LEOVIC, D. et al. Hh-Gli signaling pathway activity in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head and Neck**, v. 34, n. 1, p. 104-112, 2012.

LI, F. et al. Sonic hedgehog signaling induces vascular smooth muscle cell proliferation via induction of the G1 cyclin-retinoblastoma axis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 9, p. 1787-1794, 2010.

LI, J. et al. Immunohistochemical evidence of prognostic value of hedgehog pathway components in primary gallbladder carcinoma. **Surgery Today**, v. 42, n. 8, p. 770-775, 2012.

LIU, W. et al. Oral cancer development in patients with leukoplakia clinicopathological factors affecting outcome. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1-7, 2012.

MA, X. et al. Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 1698-1705, 2005.

MILLER, C.S.; JOHNSTONE, B.M. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982–1997. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 91, p. 622–635, 2001.

MONZO, M. et al. Sonic hedgehog mRNA expression by real-time quantitative PCR in normal and tumor tissues from colorectal cancer patients. **Cancer Letters**, v. 233, p. 117-123, 2006.

MORTON, J.P. et al. Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 104, n. 12, p. 5103-5108, 2007.

MUKHERJEE, S. et al. Hedgehog signaling and response to Cyclopamine differ in epithelial and stromal cells in benign breast and breast cancer. **Cancer Biology and Therapy**, v. 5, 674-683, 2006.

NAIR, S. et al. Obesity and the Endometrium: Adipocyte-Secreted Proinflammatory TNF α Cytokine Enhances the Proliferation of Human Endometrial Glandular Cells. **Obstetrics and Gynecology Internacional**, e:368543, 2013.

NANKIVELL, P. et al. The binary oral dysplasia grading system: validity testing and suggested improvement. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 115, n. 1, p. 87-94, 2013.

NEVILLE, B.W.; DAY, T.A. Oral Cancer and Precancerous Lesions. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.

NISHIMAKI, H. et al. A role of activated Sonic Hedgehog signalling for the cellular proliferation of oral squamous cell carcinoma cell lines. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 314, p. 313-29, 2004.

OMENETTI, A. et al. Hedgehog signaling regulates epithelial mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. **Journal of Clinical Investigations**, v. 118, p. 3331-3342, 2008.

ONISCU, A. et al. Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia. **Journal of Pathology**, v. 203, n. 4, p. 909-917, 2004.

PATIL, M.A. et al. Hedgehog signaling in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Biology and Therapy**, v. 5, p. 111-117, 2006.

PO, A. et al. Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. **EMBO Journal**, v. 29, p. 2646-2658, 2010.

RAMASUBRAMANIAN, A. et al. Immunohistochemical evaluation of oral epithelial dysplasia using cyclin-D1, p27 and p63 expression as predictors of malignant transformation. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 4, n. 2, p. 349-358, 2013.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 1, p. 47-62, 2003.

REIFENBERGER, J. et al. Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. **Cancer Research**, v. 58, p. 1798-1803, 1998.

RUSSELL, A. et al. Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer. **Oncogene**, v. 18, n. 11, p. 1983-1991, 1999.

RUTTER, M. et al. Gli2 influences proliferation in the developing lung through regulation of cyclin expression. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 42, n. 5, p. 615-625, 2010.

SANCHEZ, P.; CLEMENT, V.; ALTABA, R.A. Therapeutic targeting of the hedgehog- GLI pathway in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 65, p. 2990-2992, 2005.

SCHNEIDER, S. et al. Expression of the Sonic hedgehog pathway in squamous cell carcinoma of the skin and the mucosa of the head and neck. **Head and Neck**, v. 33, n. 2, p. 244-250, 2011.

SICKLICK, J.K. et al. Dysregulation of the hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 748-757, 2006.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer Statistics 2013. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, p. 11-20, 2013.

SOUZAKI, M. et al. Hedgehog signaling pathway mediates the progression of non-invasive breast cancer to invasive breast cancer. **Cancer Science**, v. 102, p. 373-381, 2011.

SONG, Y. et al. Altered expression of PTCH and HHIP in gastric cancer through their gene promoter methylation: novel targets for gastric cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 7, n. 4, p. 1159-1168, 2013.

SOUZA, R.L. et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v. 16, n. 6, p. 757-762, 2011.

STECCA, B.; ALTABA, R.A. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by Hedgehog and non-Hedgehog signals. **Journal of Molecular and Cellular Biology**, v. 2, p. 84-95, 2010.

STEWART, G.A. et al. Expression of the developmental Sonic hedgehog (Shh) signalling pathway is up-regulated in chronic lung fibrosis and the Shh receptor

patched 1 is present in circulating T lymphocytes. **Journal of Pathology**, v. 199, p. 488–495, 2003.

SZARKA, K. et al. Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, n. 4, p. 314–318, 2009.

TAIPALE, J. et al. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. **Nature**, v. 406, p. 1005–1009, 2000.

TEN HAAF, A. et al. Expression of the glioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1) in human breast cancer is associated with unfavourable overall survival. **BMC Cancer**, v. 9, p. 298, 2009.

THAYER, S.P. et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. **Nature**, v. 425, p. 851–856, 2003.

TUKACHINSKY, H.; LOPEZ, L.V.; SALIC, A. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of Sufu-Gli protein complexes. **Journal of Cellular Biology**, v. 191, p. 415–428, 2011.

TURATTI, E. et al. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. **Journal of Oral Science**, v. 47, n. 2, p. 71–76, 2005.

VELCHETI, V.; GOVINDAN, R. Hedgehog signaling pathway and lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 2, p. 7–10, 2007.

XIE, J. et al. Activating smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. **Nature**, v. 391, p. 90–92, 1998.

XUAN, Y.H. et al. Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. **Modern Pathology**, v. 19, n. 8, p. 1139–1147, 2006.

WALTERHOUSE, D.O.; YOON, J.; IANNACCONE, P. M. Developmental pathways: Sonic Hedgehog-Patched-Gli. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 167–171, 1999.

WANG, Y.F. et al. Expression of Hedgehog signaling molecules as a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. **Head and Neck**, v. 34, n. 11, p. 1556–1561, 2012.

WANG, Z. et al. Involvement of potential pathways in malignant transformation from oral leukoplakia to oral squamous cell carcinoma revealed by proteomic analysis. **BMC Genomics**, v. 10, p. 383, 2009.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 36, p. 575-580, 2007.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 127-133, 2008..

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 45, p. 309-316, 2009.

WATKINS, D.N. et al. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. **Nature**, v. 422, p. 313-317, 2003.

WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 323-330, 1995.

WETMORE, C. Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 13, n. 1, p. 34-42, 2003.

YAN, M. et al. HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 47, n. 6, p. 504-509, 2011.

YANG, L. et al. Activation of the hedgehog signaling pathway in human cancer and the clinical implications. **Oncogene**, v. 9, p. 469-481, 2010.

YAUCH, R. et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. **Nature**, v. 455, p. 406-411, 2008.

YOSHIKAWA, K. et al. Sonic hedgehog relates to colorectal carcinogenesis. **Journal of Gastroenterology**, v. 44, p. 1113–1117, 2009.

ANEXO

Tabela 1. Escore de imunomarcção para DEO, MNN, hiperqueratose e HFI.

		DEO n (%)	Hiperqueratose n (%)	HFI n (%)	MNN n (%)
SHH	-	11 (44)	4 (80)	8 (100)	4 (100)
	1+	4 (16)	1 (20)	-	-
	2+	8 (32)	-	-	-
	3+	2 (8)	-	-	-
PTCH1	-	2 (8)	-	3 (37,5)	-
	1+	2 (8)	-	2 (25)	2 (50)
	2+	4 (16)	3 (60)	2 (25)	2 (50)
	3+	17 (68)	2 (40)	1 (12,5)	-
SUFU	-	14 (56)	4 (80)	7 (87,5)	4 (100)
	1+	3 (12)	1 (20)	1(12,5)	-
	2+	4 (16)	-	-	-
	3+	4 (16)	-	-	-
HHIP	-	8 (32)	5 (100)	6 (75)	4 (100)
	1+	4 (16)	-	2 (25)	-
	2+	3 (12)	-	-	-
	3+	10 (40)	-	-	-
GLI1	-	4 (16)	4 (80)	8 (100)	3 (75)
	1+	0 (0)	1 (20)	-	1 (25)
	2+	2 (8)	-	-	-
	3+	19 (76)	-	-	-
CCND1	-	6 (24)	1 (20)	6 (75)	4 (100)
	1+	9 (36)	4 (80)	2 (25)	-
	2+	6 (24)	-	-	-
	3+	4 (16)	-	-	-

Nota: Escore de Imunomarcção (Gurgel et al., 2008) - (-) Negativo, até 5% de células imunomarcadas; (1+) Discreta, entre 6-25% de células imunomarcadas; (2+) Moderada, entre 26-50% de células imunomarcadas; (3+) Intensa, mais de 50% de células imunomarcadas

