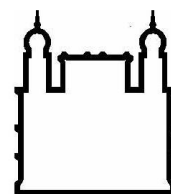




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PÊSQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DE COMPONENTES DA VIA SONIC
HEDGEHOG, STAT3 E MCM3 EM TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR**

MANUELA TORRES ANDION VIDAL

**Salvador - Bahia - Brasil
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PÊSQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DE COMPONENTES DA VIA SONIC
HEDGEHOG, STAT3 E MCM3 EM TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR**

MANUELA TORRES ANDION VIDAL

Orientador: Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos

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

**Salvador - Bahia - Brasil
2015**

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

V648e	<p>Vidal, Manuela Torres Andion Estudo imunistoquímico de componentes da Via Sonic Hedgehog, Stat3 e Mcm3 em tumores de glândula salivar / Manuela Torres Andion Vidal. - 2015. 89 f. : il. ; 30 cm.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos, Laboratório. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.</p> <p>1. Carcinoma adenóide cístico. 2. Carcinoma mucoepidermóide. 3. Adenoma Pleomorfo, 4. Proteínas Hedgehog. I. Título.</p> <p>CDU 616-006.6</p>
-------	---

**"ESTUDO IMUNOISTOQUIMICO DE COMPONENTES DA VIA SONIC HEDGEHOG, STAT3 E MCM3 EM
TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR"**

MANUELA TORRES ANDION VIDAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Roseana de Almeida Freitas Professora
Professora Titular
UFRN



Dra. Cláudia Araújo Gurgel Rocha
Pesquisadora
CPqGM/FIOCRUZ



Dr. Jean Nunes dos Santos
Professor Associado
UFBA

Aos meus pais, Manuel e Cristina, fontes
do amor mais puro e incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Manuel e Cristina,

Por terem me criado com tanto amor e dedicação, sem medir esforços. Por me ensinarem a ser grata pelo que tenho e por me mostrarem, todos os dias, que a felicidade só depende de nós mesmos.

Ao meu irmão, Daniel,

Exemplo de dedicação e perseverança. Ele me ensinou que jamais devemos desistir dos nossos sonhos e que podemos até perder o amigo, mas a piada jamais!

Ao meu marido, Danilo,

Há dez anos tornando as vitórias mais alegres e as derrotas mais suaves. Com ele, o caminho é mais leve, doce e bem humorado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Nunes,

Sempre acessível e disposto a me ajudar. Serei eternamente grata pelas oportunidades, pela confiança e por todo aprendizado que me proporcionou.

À Profa. Dra. Clarissa Gurgel,

Um exemplo de profissional que tenho muita admiração. Agradeço todo carinho e apoio.

À Profa. Adna Barros,

Sempre solícita, me auxiliou na obtenção de parte dos casos e dos dados clínicos.

À Profa. Fabíola Carvalho,

Pela amizade e por se fazer presente todos os dias, me aconselhando e incentivando.

À Profa. Marianna Torres,

Que despertou meu interesse pela Radiologia e me acolheu com tanta fofura. Obrigada pelas oportunidades e pela torcida.

À Ludmila Valverde,

Pela companhia incansável e pelas inúmeras vezes que me ajudou, em especial com a realização da imunoistoquímica. Sou grata e reconheço todo seu esforço.

Ao grupo de Biopatologia,

Em especial Rosane Borges, Vanessa Guimarães e Paula Carmel, sempre dispostas a me ajudar.

À minha família,

Tios, tias, primos e primas, em especial minhas avós, que sempre ajudaram na minha formação.

À família Guimarães Viana,

Que me encham de carinho e apoio.

Ao Curso de Pós Graduação em Patologia,

Em especial ao corpo docente, por me proporcionar tanto aprendizado e amadurecimento, e à Ana Carolina e Simone, por facilitarem toda parte burocrática.

Aos colegas do mestrado,

Em especial Ludmila Valverde e Martha Suarez, pela convivência.

Ao Hospital Aristides Maltez,

Pela parceria e por viabilizar a execução dessa pesquisa através da disponibilização de parte dos casos.

Ao Hospital A.C. Camargo,

Em especial, ao Dr. Fernando Augusto Soares e à Dra. Silvia Lourenço, pela parceria e por ceder, gentilmente, parte dos casos. E à Renata Ianes, por auxiliar na obtenção dos dados clínicos.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia,

Especialmente aos mestres e funcionários que contribuíram para a minha formação.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM),

Por me proporcionar a estrutura necessária para a realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular,

Em especial Dr. Mitermayer, Cleiton e Rosane, pela convivência agradável.

À Biblioteca do CPqGM,

Em especial à Sra. Ana Fiscina, pelo auxílio na formatação deste trabalho.

Ao Conselho Nacional em Pesquisa,

Pelo apoio financeiro.

À Deus,

Por colocar pessoas maravilhosas em minha vida.

Grandes realizações são possíveis
quando se dá importância aos
pequenos começos.

Lao-Tse

VIDAL, Manuela Torres Andion. Estudo imunohistoquímico de componentes da via Sonic Hedgehog, STAT3 e MCM3 em tumores de glândula salivar. 89 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

O adenoma pleomórfico (AP), o carcinoma mucoepidermóide (CME) e o carcinoma adenóide cístico (CAC) representam tumores frequentes em glândula salivar. A via de sinalização *Sonic Hedgehog* (Hh) e o Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) desempenham funções importantes na proliferação celular, favorecendo o desenvolvimento tumoral e a proteína MCM3 tem sido considerada uma nova classe de marcadores de proliferação celular. Portanto, o presente trabalho propõe-se a estudar componentes da via Hh, bem como o STAT3 e o MCM3 em neoplasias de glândula salivar, na tentativa de adicionar informações sobre as características biológicas dessas neoplasias. Foram utilizados 9 casos de AP, 17 casos de CAC e 20 casos de CME e, por meio da técnica imunohistoquímica, realizou-se a detecção das seguintes proteínas: SHH, GLI1, SUFU, HHIP, STAT3 e MCM3. No AP, observou-se alta expressão citoplasmática de SHH e SUFU, e baixa expressão de STAT3 e MCM3. No CAC, observou-se alta expressão de GLI1, HHIP e STAT3 e baixa expressão de SHH, SUFU e MCM3. No CME, observou-se alta expressão de SHH, GLI1, SUFU e HHIP e baixa expressão de STAT3 e MCM3. Quando comparado entre os tipos tumorais, observou-se diferença estatisticamente significativa para expressão de SHH ($p=0.0064$), STAT3 ($p=0.0003$) e MCM3 ($p=0.0257$). Ao comparar a marcação parenquimal e estromal, observou-se maior expressão em parênquima para todos os tumores ($p<0.05$). Em glândula salivar normal, observou-se marcação citoplasmática das células ductais para SHH, GLI1, SUFU e HHIP, uma discreta marcação citoplasmática para STAT3 e ausência de marcação para MCM3. Não foi observada correlação entre a via Hh e STAT3 nos tumores de glândula salivar ($p>0.05$). Os resultados desse trabalho apontam para uma possível participação da via Hh na morfogênese e no desenvolvimento do AP, CAC e CME, assim como a participação do STAT3 no desenvolvimento do CAC. Em adição, o MCM3 não parece ser um bom marcador de proliferação para tumores de glândula salivar. Sugerimos que novos estudos sejam realizados visando compreender o mecanismo pelo qual a via Hh e o STAT3 promovem o crescimento e progressão desses tumores e identificar inibidores dessas vias.

Palavras-chave: Carcinoma Adenóide Cístico, Carcinoma Mucoepidermóide, Adenoma Pleomorfo, Proteínas Hedgehog, Fatores de Transcrição STAT, Componente 3 do Complexo de Manutenção de Micromossomo.

VIDAL, Manuela Torres Andion. Immunohistochemical study of components of Sonic Hedgehog pathway, STAT3 and MCM3 in salivary gland tumors. 89 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

The pleomorphic adenoma (PA), mucoepidermoid carcinoma (MEC) and the adenoid cystic carcinoma (ACC) are common tumors arising from salivary glands. The Sonic Hedgehog signaling pathway (Hh) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) play important roles in cell proliferation, favoring tumor growth. The MCM3 protein has been considered as a novel class of cell proliferation markers. The aim of this investigation was to study components of the Hh pathway, as well as STAT3 and MCM3 in salivary gland neoplasms in an attempt to add information about the biological characteristics of these neoplasms. We used 9 cases of PA, 17 cases of ACC and 20 cases of MEC. Using immunohistochemistry, were investigated: SHH, GLI1, Sufu, HHIP, STAT3 and MCM3. In PA, there was high expression of cytoplasmic SHH and Sufu, and low expression of STAT3 and MCM3. In the ACC, there was high expression of GLI1, HHIP and STAT3 and low expression of SHH, SUFU and MCM3. In the MEC, we observed high expression of SHH, GLI1, SUFU and HHIP and low expression of STAT3 and MCM3. There was a statistically significant difference between SHH ($p=0.0064$), STAT3 ($p=0.0003$) and MCM3 ($p=0.0257$) when all tumors were compared. And a higher expression in parenchyma for all tumors when stroma and parenchyma were compared ($p<0.05$). In normal salivary gland, ductal segment showed immunolabeling for SHH, GLI1, SUFU and HHIP, a discrete cytoplasmic labeling for STAT3 and MCM3 was negative. No correlation was observed between the Hh pathway and STAT3 in salivary gland tumors ($p>0.05$). The findings suggest a possible role of Hh pathway in the morphogenesis and development of AP, CAC and CME, as well as the participation of STAT3 in the development of ACC. In addition, the MCM3 did not seem to be a good marker of proliferation for salivary gland tumors. It is important that further studies be conducted to understand the mechanism by which the Hh pathway and the STAT3 promote the growth and progression of these tumors and inhibitors of these pathways might be identified.

Key words: Adenoid Cystic Carcinoma, Mucoepidermoid Carcinoma, Pleomorphic Adenoma, Hedgehog Proteins, STAT Transcription Factors, Minichromosome Maintenance Complex Component 3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via Sonic Hedgehog.....	27
Figura 2	Ativação do STAT.....	28
Figura 3	Imunomarcção de SHH.....	43
Figura 4	Imunomarcção de GLI1.....	44
Figura 5	Imunomarcção de SUFU.....	45
Figura 6	Imunomarcção de HHIP.....	46
Figura 7	Imunomarcção de STAT3.....	47
Figura 8	Imunomarcção de MCM3.....	48
Figura 9	Imunoexpressão dos componentes da via Hh nos diferentes tumores de glândula salivar.....	50
Figura 10	Imunoexpressão de STAT3 nos diferentes tumores de glândula salivar.....	51
Figura 11	Imunoexpressão de MCM3 nos diferentes tumores de glândula salivar.....	51
Figura 12	Índice de marcação dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 nos diferentes graus de CME.....	54
Figura 13	Imunomarcção estromal de SHH, GLI1, SUFU e HHIP.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpo, marca, clone, diluição recuperação antigênica e controle positivo.....	35
Tabela 2	Índices de marcação dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 nos tumores de glândula salivar.....	42
Tabela 3	Relação da expressão dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 nos tumores de glândula salivar.....	50
Tabela 4	Comparação da expressão de componentes da via Hh, do STAT3 e do MCM3 entre dois tipos de tumores de glândula salivar.....	52
Tabela 5	Comparação dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 entre os três graus histológicos do CME.....	53
Tabela 6	Comparação dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 entre os tipos histológicos do CAC.....	54
Tabela 7	Correlação entre os componentes da via Hh, STAT3 e MCM3.....	56
Tabela 8	Comparação da expressão dos componentes da via Hh no parênquima e estroma nos diferentes tumores de glândula salivar.....	58
Tabela 9	Relação entre a imunexpressão e os dados clínicos e inflamação dos casos de AP.....	61
Tabela 10	Relação entre a imunexpressão e os dados clínicos e inflamação dos casos de CAC.....	62
Tabela 11	Relação entre a imunexpressão e os dados clínicos e inflamação dos casos de CME.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Adenoma Pleomórfico
CAC	Carcinoma Adenóide Cístico
CME	Carcinoma Mucoepidermóide
H/E	Hematoxilina/Eosina
OMS	Organização Mundial de Saúde
Hh	Do inglês: “ <i>Hedgehog</i> ”
SHH	Do inglês: “ <i>Sonic hedgehog</i> ”
DHH	Do inglês: “ <i>Desert hedgehog</i> ”
IHH	Do inglês: “ <i>Indian hedgehog</i> ”
GLI1	Do inglês: “ <i>glioma-associated oncogene 1</i> ”
GLI2	Do inglês: “ <i>glioma-associated oncogene 2</i> ”
GLI3	Do inglês: “ <i>glioma-associated oncogene 3</i> ”
PTCH	Do inglês: “ <i>receptor Patched</i> ”
SMO	Do inglês: “ <i>transmembrane transducer Smoothened</i> ”
SUFU	Do inglês: “ <i>suppressor of fused</i> ”
COS-2	Do inglês: “ <i>atypical kinesin Costal-2</i> ”
FU	Do inglês: “ <i>serine-threonine kinase Fused</i> ”
HHIP	Do inglês: “ <i>Hedgehog-interacting protein</i> ”
STAT	Do inglês: “ <i>Signal transducer and activator of transcription</i> ”
STAT 3	Do inglês: “ <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> ”
JAK	Do inglês: “ <i>Janus kinase</i> ”
nRTK	Do inglês: “ <i>Non-receptor tyrosine kinase</i> ”
SOCS	Do inglês: “ <i>suppressor of cytokine signaling</i> ”
PIAS	Do inglês: “ <i>protein inhibitor of activated STAT</i> ”

IL	Interleucina
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
MCM	Do inglês: “ <i>minichromosome maintenance</i> ”
MCM3	Do inglês: “ <i>minichromosome maintenance 3</i> ”
<i>PLAG1</i>	Do inglês: “ <i>Pleomorphic adenoma gene 1</i> ”
CRTC1	Do inglês: “ <i>CREB-regulated transcription coactivator 1</i> ”
MAML2	Do inglês: “ <i>mastermind-like 2</i> ”
WNT	Do inglês: “ <i>Wingless-type MMTV integration site family</i> ”
Lef1	Do inglês: “ <i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i> ”
<i>BCL2</i>	Do inglês: “ <i>B-cell lymphoma 2</i> ”
TTF-1	Do inglês: “ <i>Thyroid transcription factor-1</i> ”
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
µm	Micrômetros
°C	Graus Celsius
h	Hora
TRIS-HCl	Tris hidroximetil aminometano cloridrato
DAB	3-3' diaminobenzidina
IM	Índice de marcação
n	Número de casos
pH	Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	19
2.2	ADENOMA PLEOMÓRFICO.....	21
2.3	CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE.....	22
2.4	CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO.....	24
2.5	VIA SONIC HEDGEHOG (HH).....	25
2.6	TRANSDUTOR DE SINAL E ATIVADOR DA TRANSCRIÇÃO (STAT3).....	28
2.7	VIA HH E STAT3.....	31
2.8	PROTEÍNA E MANUTENÇÃO DO MICROSSOMO 3 (MCM3).....	32
3	OBJETIVOS	
	GERAL.....	33
	ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	34
4.2	SELEÇÃO DOS CASOS.....	34
4.3	TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA.....	34
4.4	EXAME IMUNOISTOQUÍMICO.....	36
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS	
5.1	IMUNOMARCAÇÃO DE SHH.....	38
5.2	IMUNOMARCAÇÃO DE GLI1.....	38
5.3	IMUNOMARCAÇÃO DE SUFU.....	39
5.4	IMUNOMARCAÇÃO DE HHIP.....	30
5.5	IMUNOMARCAÇÃO DE STAT3.....	41
5.6	IMUNOMARCAÇÃO DE MCM3.....	41
5.7	COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA HH, STAT3 E MCM3 ENTRE OS TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR.....	49
5.8	COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA HH, STAT3 E MCM3 ENTRE OS DIFERENTES GRAUS HISTOLÓGICOS DE CME	52
5.9	COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA HH, STAT3 E MCM3 ENTRE OS DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DE CAC.	55
5.10	CORRELAÇÃO ENTRE OS COMPONENTES DA VIA HH, STAT3 E MCM3..	56
5.11	COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA HH, DO STAT3 E DO MCM3 NO PARÊNQUIMA E NO ESTROMA DOS TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR.....	57
5.12	RELAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA HH, STAT3 E MCM3 COM OS DADOS CLÍNICOS E INFLAMAÇÃO.....	60
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias de glândula salivar são incomuns, representando cerca de 3-10% de todos os tumores de cabeça e pescoço (ANSARI, 2007; DE OLIVEIRA et al., 2009). É considerado um grupo de tumores heterogêneo, uma vez que apresentam inúmeros tipos histológicos e comportamentos biológicos distintos (YIH; KRATOCHVIL; STEWART, 2005; LI et al., 2008; STENMAN; PERSSON; ANDERSSON, 2014). O adenoma pleomórfico (AP), o carcinoma mucoepidermóide (CME) e o carcinoma adenóide cístico (CAC) são os tumores mais comuns de glândula salivar (AL-KHATEEB; ABABNEH, 2007; NAGAO et al., 2012; ADAMS; WARNER; NÖR, 2013), destacando-se este último por sua capacidade de invasão perineural (AMIT et al., 2014).

A via de sinalização *Sonic Hedgehog* (Hh) desempenha funções importantes no desenvolvimento embrionário, na proliferação e diferenciação celulares e na carcinogênese (TOFTGARD, 2000; RUIZ I ALTABA; SÁNCHEZ; DAHMANE, 2002; CHENG et al., 2009; DAI et al., 2011; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). *Sonic hedgehog* (SHH) é uma proteína ligante da via de sinalização Hh, que ao ser secretada, liga-se ao receptor *Patched* (PTCH), inativando o efeito inibitório desse receptor sobre a proteína transmembrânica *Smoothed* (SMO). Esta, por sua vez, desencadeia uma série de eventos intracelulares, resultando na ativação de fatores de transcrição da família *glioma-associated oncogene* (GLI), o que induz a expressão de genes alvo, que regulam a proliferação, a diferenciação e as interações com a matriz extracelular (RUIZ I ALTABA; SÁNCHEZ; DAHMANE, 2002; COHEN, 2003; MA; XIAO; HE, 2008; TZELEPI et al., 2011; MERCHANT, 2012). A ativação aberrante da via Hh tem sido identificada em diversas neoplasias, incluindo tumores hematológicos (SENGUPTA et al., 2007), carcinomas de mama (IM et al., 2013), estômago (WAN et al., 2014) esôfago (YANG et al., 2012a), boca (WANG et al., 2012), pâncreas (HAO

et al., 2013), fígado (CHENG et al., 2009), próstata (KIM et al., 2011) e tireóide (HINTERSEHER et al., 2014).

O Transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT) é uma família de fatores de transcrição que permanecem latentes quando localizados no citoplasma, e são ativados por meio de fosforilações (DARNELL, 1997). Um número grande de neoplasias malignas possui proteínas STATs constitutivamente ativadas, mais frequentemente o STAT3 (DOBI et al., 2013; HAN et al., 2013; SUBRAMANIAM et al., 2013; CHUNG et al., 2014; XU; LU, 2014). A ativação constitutiva do STAT3 pode aumentar a proliferação e conduzir a transformação celular, favorecendo o desenvolvimento tumoral (BROMBERG et al., 1999; SONG et al., 2003; LI et al., 2007; YU; PARDOLL; JOVE, 2009).

A família de proteínas de manutenção do minicromossomo (MCM) é composta por seis membros (MCM2-7), que desempenham papéis importantes na replicação do DNA e na progressão do ciclo celular (FORSBURG, 2004; LEE et al., 2010; ASHKAVANDI et al., 2013). Essas proteínas são expressas em células que estão em divisão, enquanto que em células quiescentes ocorre a perda de expressão (ENDL et al., 2001; DE ANDRADE et al., 2013; LAMEIRA et al., 2014). Portanto, a proteína MCM3 tem sido considerada um novo marcador de proliferação celular (MADINE et al., 2000; FORSBURG, 2004; LAMEIRA et al., 2014).

Sabe-se que a ativação aberrante da via Hh tem sido identificada em diversas neoplasias (YANG et al., 2012a; HAO et al., 2013; IM et al., 2013; GURGEL et al., 2014; HINTERSEHER et al., 2014; WAN et al., 2014), bem como o STAT3, por possuir funções importantes no desenvolvimento tumoral (BROMBERG et al., 1999; LI et al., 2007; SENGUPTA et al., 2007; BOURNAZOU; BROMBERG, 2013) e o MCM3 por ser um novo marcador de proliferação celular (MADINE et al., 2000; FORSBURG, 2004; LAMEIRA et al., 2014). Destarte, tendo em vista que, ao nosso conhecimento, somente existem dados sobre o papel da via Hh em glândula salivar normal (JASKOLL et al., 2004; HASHIZUME; HIEDA,

2006; FIASCHI et al., 2011), apenas poucos estudos utilizando STAT3 (ARAÚJO et al., 2008; NIKITAKIS et al., 2009a, 2009b; Ettl et al., 2012) e MCM3 (ASHKAVANDI et al., 2013) em neoplasia de glândula salivar, o presente trabalho propõe-se a estudar componentes da via Hh, bem como o STAT3 e o MCM3 em neoplasias de glândula salivar, na tentativa de adicionar informações sobre as características biológicas dessas neoplasias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os tumores de glândula salivar são incomuns e caracterizados por grande variedade morfológica (MCHUGH; VISSCHER; BARNES, 2009; STENMAN; PERSSON; ANDERSSON, 2014). Geralmente são assintomáticos e acometem homens e mulheres entre a terceira e sexta décadas de vida, podendo exibir aumento da região afetada. Desenvolvem-se principalmente nas glândulas parótida, submandibular e glândulas menores da região do palato (JABER, 2006; ATANDA et al., 2009; BARROS et al., 2010; JAAFARI-ASHKAVANDI; ASHRAF; MOSHAVERINIA, 2013), destacando-se o adenoma pleomórfico (AP) entre os tumores benignos, e o carcinoma adenóide cístico (CAC) e o carcinoma mucoepidermóide (CME) entre os tumores malignos (AL-KHATEEB; ABABNEH, 2007; NAGAO et al., 2012; ADAMS; WARNER; NÖR, 2013).

A histogênese do AP é um tema controverso, porém, alguns autores referem-se ao processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM), no qual as células epiteliais neoplásicas passam a expressar moléculas do fenótipo mesenquimal, dando origem ao adenoma pleomórfico (AIGNER et al., 1998; ENESCU et al., 2013). A histogênese dos tumores malignos de glândula salivar é alvo de muitos estudos, porém acredita-se que a transformação neoplásica a partir de células de reserva ou células basais presentes nos ductos excretores ou intercalares, seja responsável pelo desenvolvimento dos tumores de glândula salivar (BOAHENE et al., 2004; AKRISH et al., 2009; ADAMS; WARNER; NÖR, 2013). A transformação maligna das células de reserva do ducto intercalar origina o CAC (AKRISH et al., 2009; ADAMS; WARNER; NÖR, 2013), enquanto que a transformação maligna de células do ducto excretor origina o CME (BOAHENE et al., 2004; AKRISH et al., 2009; ADAMS; WARNER; NÖR, 2013).

O AP origina-se a partir de uma mutação no gene *PLAG1*, sendo este responsável pela tradução da oncoproteína PLAG1, que funciona como um fator de transcrição. Acredita-se que a desregulação desse gene desenvolve papel importante na gênese do AP (BARNES et al., 2005; RAHNAMA et al., 2013). No CME, a anormalidade citogenética mais comum é a translocação entre os cromossomos 11 e 19, que desencadeia a fusão de CRTC1 (CREB-regulated transcription coactivator 1)-MAML2 (mastermind-like 2), formando uma oncoproteína que atua como fator de transcrição em vias regulatórias, como a via de sinalização *Notch*, contribuindo para o desenvolvimento do tumor (O'NEILL, 2009; ADAMS; WARNER; NÖR, 2013; SIMPSON et al., 2014). A anormalidade genética mais comum no CAC é a translocação entre os cromossomos 6 e 9, resultando na fusão da proteína MYB-NFIB, que está envolvida no controle do ciclo celular, na angiogênese e na apoptose (PERSSON et al., 2009; ADAMS; WARNER; NÖR, 2013).

O diagnóstico de tumores de glândulas salivares é realizado através da avaliação da arquitetura histológica, da diferenciação celular e dos componentes do estroma tumoral, em associação com as informações clínicas e imaginológicas (NAGAO et al., 2012). Além disso, nos tumores malignos, a invasão de tecidos adjacentes é importante para o diagnóstico e prognóstico tumoral (SIMPSON et al., 2014). Apesar da hematoxilina/eosina (H/E) ser o método padrão-ouro utilizado no diagnóstico de tumores de glândula salivar, a imunohistoquímica pode melhorar a precisão do diagnóstico, sendo útil na análise da diferenciação e da proliferação celular e da expressão de proteínas tumorais (NAGAO et al., 2012).

Atualmente, o conhecimento sobre a patogênese dos tumores de glândula salivar tem avançado. A maioria das alterações moleculares tumorais desencadeia a ativação de fatores de transcrição envolvidos na regulação do ciclo celular, da apoptose e da diferenciação celular. A

descoberta de biomarcadores é fundamental para o diagnóstico e para o desenvolvimento de novos medicamentos para esses tumores (STENMAN; PERSSON; ANDERSSON, 2014).

2.2 ADENOMA PLEOMÓRFICO

O adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia benigna de glândula salivar mais comum. Acomete principalmente a glândula parótida, porém pode ser encontrado na submandibular, sublingual e glândulas menores (ALVES et al., 2002; DANIELS et al., 2007; BARROS et al., 2010; ERDEM et al., 2011; RAHNAMA et al., 2013). Possui essa nomenclatura devido ao pleomorfismo arquitetônico observado em microscopia de luz. No passado, era conhecido como "tumor misto", por apresentar elementos epiteliais e mioepiteliais em sua composição (RAHNAMA et al., 2013). Ocorre com mais frequência entre 30 e 60 anos de idade, e possui predileção pelo sexo feminino. Os pacientes usualmente apresentam uma massa de crescimento lento e indolor. Embora a progressão seja lenta, se não tratado, o tumor pode causar significativa morbidade e, mais raramente, morte (ALVES et al., 2002; DANIELS et al., 2007; BARROS et al., 2010; ERDEM et al., 2011; RAHNAMA et al., 2013).

Histologicamente, o AP é um tumor epitelial com morfologia complexa, constituído por elementos epiteliais, mioepiteliais e estruturas ductiformes arranjadas em diversos padrões, dispersos em uma matriz condróide, mixóide, hialina ou óssea. A cápsula é formada a partir da fibrose do tecido conjuntivo, a qual é comprimida pela massa tumoral. Possui espessura e integridade variável, e é conhecida como "falsa cápsula ou pseudocápsula" (CHIDZONGA; LOPEZ PEREZ; PORTILLA-ALVAREZ, 1995; VARGHESE et al., 2003; MCHUGH; VISSCHER; BARNES, 2009).

Segundo Soares et al. (2009), a recorrência do AP está relacionada com a ruptura da cápsula, a recessão incompleta das microextensões do parênquima ou a sua origem multifocal. Um estudo realizado por Soares et al. (2012) observou uma maior expressão de fatores de

crescimento (PDGF-A, PDGF-B e FGF-2) em adenomas pleomórficos recorrentes quando comparado com aqueles não recorrentes. Além disso, casos de adenoma pleomórfico recorrente com transformação maligna apresentaram uma superexpressão desses fatores de crescimento.

Ocasionalmente, o componente epitelial pode sofrer transformação maligna, de forma isolada, dando origem ao carcinoma ex-adenoma pleomórfico, ou em associação com o estroma, originando o carcinossarcoma. Ambos são tumores malignos agressivos, no entanto, as lesões metastáticas identificadas em pacientes com histórico de AP, apresentam as características histológicas benignas do AP (TARSITANO et al., 2014). Aproximadamente 6% dos APs podem sofrer transformação maligna, tornando-se agressivos, com capacidade de gerar metástases e morte (RAHNAMA et al., 2013).

O tratamento indicado é a excisão cirúrgica ampla para obter margens negativas. A maioria desses tumores ocorre na parótida e, para esses casos, o tratamento utilizado é a remoção parcial ou total da parótida com preservação do nervo facial (MENDENHALL et al., 2008; ERDEM et al., 2011; LINGAM et al., 2011; TARSITANO et al., 2014).

2.3 CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE

O carcinoma mucoepidermóide (CME) é o tumor maligno mais prevalente em glândula salivar maior e menor (AUCLAIR; GOODE; ELLIS, 1992; GOODE; AUCLAIR; ELLIS, 1998; LUNA, 2006; TRIANTAFILLIDOU et al., 2006a; BARROS et al., 2010; ADAMS; WARNER; NÖR, 2013). Acomete, principalmente, pacientes entre a terceira e quinta décadas de vida, com idade média de 45 anos (LUNA, 2006). Alguns estudos demonstram preferência pelo sexo feminino (AUCLAIR; GOODE; ELLIS, 1992; BOAHENE et al., 2004; RAPIDIS et al., 2007; BAI et al., 2013). A parótida é a glândula maior mais afetada; das glândulas salivares menores, o palato é o local mais frequentemente acometido (LOYOLA et al., 1995; LUNA, 2006; BAI et al., 2013). Clinicamente, apresenta-se como um crescimento nodular indolor,

porém em alguns casos, outros sintomas como dor, ulceração e sangramento podem estar presentes (LOYOLA et al., 1995; BOAHENE et al., 2004).

Histologicamente, é composto por proporções variadas de células epidermóides, mucosas, intermediárias, colunares e claras, arrançadas em grupos ou distribuídas aleatoriamente ou, ainda, dispostas entre formações císticas (BARNES et al., 2005; LUNA, 2006). De acordo com as características morfológicas e citológicas, são classificados em tumores de baixo, intermediário e alto grau de malignidade (RAPIDIS et al., 2007; MCHUGH et al., 2012). Os tumores de baixo grau são caracterizados por proeminente formação cística, raras áreas celulares sólidas e grande proporção de células mucosas. O grau intermediário apresenta predomínio de células intermediárias dispostas em ilhas e pouca formação cística. Em neoplasias de alto grau predomina áreas sólidas compostas por células epidermóides e intermediárias, com presença de atipia, anaplasia, múltiplas mitoses e necrose (LUNA, 2006; TRIANTAFILLIDOU et al., 2006a; TROSMAN et al., 2014).

O prognóstico do paciente está diretamente relacionado à forma de tratamento, às características clínicas e principalmente ao grau histológico da neoplasia. Os tumores de baixo grau de malignidade apresentam uma menor agressividade, e melhor prognóstico, enquanto que as neoplasias de alto grau possuem grande potencial invasivo e metastático, reduzindo a sobrevida do paciente (GOODE; AUCLAIR; ELLIS, 1998; LUNA, 2006; MCHUGH et al., 2012).

O tratamento indicado para o CME de baixo grau de glândula salivar é a excisão cirúrgica local. Em casos de tumores de alto grau é indicada a cirurgia radical com ressecção óssea e a associação da cirurgia com a radioterapia, porém esse tumor aparenta ser radioresistente (TRIANAFILLIDOU et al., 2006a; TROSMAN et al., 2014).

2.4 CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO

O carcinoma adenóide cístico (CAC) é um tumor epitelial maligno que acomete principalmente as glândulas salivares menores, sendo comum também na glândula parótida e sublingual (SOARES et al., 2008; BARROS et al., 2010; MOSKALUK, 2013). Pode desenvolver-se em diversas regiões, incluindo glândulas salivares, árvore brônquica, esôfago, glândula lacrimal, pele e mama (KHAN et al., 2001; MOSKALUK, 2013). Ocorre em uma ampla faixa etária, com maior incidência entre a quarta e sexta décadas de vida. As mulheres são acometidas com maior frequência do que os homens (GIANNINI et al., 2006; LUKŠIĆ et al., 2014). Apresenta crescimento lento e invasivo, podendo desenvolver dor, inchaço, ulceração e paralisia do nervo facial (GARCÍA DE MARCOS et al., 2008), sendo caracterizado por alta taxa de recorrência, invasão perineural e metástases à distância (TRIANAFILLIDOU et al., 2006b; SOARES et al., 2008; LUKŠIĆ et al., 2014).

Uma característica marcante do CAC é a sua capacidade de invadir tecido nervoso (WAAL, 1990; AMIT et al., 2014). A invasão perineural é definida como a presença de células tumorais viáveis no espaço perineural, enquanto que a invasão intraneural é a presença de células tumorais no interior do feixe nervoso, com ou sem destruição do axônio (AMIT et al., 2014). Rapidis et al. (2005) afirmam que a invasão perineural facilita o desenvolvimento de metástases, afetando negativamente no controle local e na sobrevida do paciente. Por outro lado, Amit et al. (2014) sugerem que a invasão intraneural, e não a invasão perineural, está associada a um pior prognóstico.

Histologicamente, é composto por células epiteliais e mioepiteliais dispostas em lençóis, ninhos sólidos, túbulos ou estruturas cribriformes e o estroma apresenta material hialino ou mucoso exibindo ainda estruturas semelhantes a cistos (BARNES et al., 2005; GARCÍA DE MARCOS et al., 2008; BRAZÃO-SILVA et al., 2013). De acordo com o padrão de crescimento, o CAC é classificado em: cribriforme, tubular e sólido, sendo que um tumor pode

conter dois ou mais subtipos (BRADLEY, 2004; SOARES et al., 2008; VIDYALAKSHMI; ARAVINDHAN, 2014). O padrão cribriforme é o mais comum, é conhecido como “queijo suíço” devido a grande presença de estruturas pseudocísticas. O padrão tubular apresenta estruturas semelhantes a ductos e, por fim, o padrão sólido que apresenta pouca ou nenhuma estrutura pseudocística e exibe maior pleomorfismo celular e atividade mitótica quando comparado com os demais padrões (GIANNINI et al., 2006; VIDYALAKSHMI; ARAVINDHAN, 2014).

Os subtipos histológicos apresentam comportamentos biológicos distintos que proporcionam prognósticos diferentes. O padrão cribriforme e tubular apresentam melhores prognósticos, enquanto que o padrão sólido apresenta pior prognóstico com maior risco de metástase (BRADLEY, 2004; GIANNINI et al., 2006; SHEN et al., 2012).

Existem várias possibilidades para o tratamento do CAC: a cirurgia, a quimioterapia, a radioterapia e a terapia combinada, sendo esta última o tratamento de escolha para a maioria dos casos (SOARES et al., 2008; SHEN et al., 2012). O acompanhamento, de qualquer que seja o caso, é necessário devido ao alto índice de recorrência e metástases à distância (TRANTAFILLIDOU et al., 2006b; MOSKALUK, 2013).

2.5 VIA SONIC HEDGEHOG (Hh)

O gene Hedgehog foi inicialmente identificado durante o desenvolvimento embrionário de moscas do gênero *Drosophila* (NÜSSLEIN-VOLHARD; WIESCHAUS, 1980). Em humanos, a via Hh participa ativamente do desenvolvimento embrionário de diversos órgãos (INGHAM; MCMAHON, 2001), incluindo as glândulas salivares (JASKOLL et al., 2004), entretanto, em tecidos adultos, a via encontra-se inativa (INGHAM; MCMAHON, 2001; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013).

São encontrados três ligantes hedgehog: Indian hedgehog (IHH), Desert hedgehog (DHH) e Sonic hedgehog (SHH) (PEPINSKY et al., 2000). Tais ligantes possuem afinidade semelhante pelos receptores transmembrânicos e ativam as mesmas cascatas de sinalização. Acredita-se que a diferença entre esses ligantes seja a especificidade tecidual e o nível de expressão em cada tecido (MERCHANT, 2012). Além dos ligantes, a via Hh é composta por um receptor transmembrânico Patched (PTCH), uma proteína transmembranar smoothed (SMO) e fatores de transcrição da família de oncogenes homólogos associados ao glioma (GLI1, GLI2 E GLI3) (INGHAM; MCMAHON, 2001; RUIZ I ALTABA; SÁNCHEZ; DAHMANE, 2002; COHEN, 2003; MA; XIAO; HE, 2008; TZELEPI et al., 2011; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). Todos os componentes da via Hh são sintetizados como precursores inativos, que após a clivagem autocatalítica de domínios específicos ou fosforilação, tornam-se ativos (WONG; REITER, 2009; MERCHANT, 2012).

Os componentes da via Hh se localizam dentro ou próximo de uma organela específica, chamada de cílio primário. Os cílios primários são extensões do citoesqueleto, formados por microtúbulos que se projetam a partir da membrana plasmática da maioria das células. São estruturas dinâmicas que são reabsorvidas durante a progressão do ciclo celular e se estendem na interfase (MICHAUD; YODER, 2006; WONG; REITER, 2009; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). Cada célula possui apenas um cílio primário (MERCHANT, 2012). Nos últimos anos, o cílio primário tem sido considerado uma organela importante, uma vez que desempenha funções na detecção e na integração de sinais das vias de sinalização celular, como a via Hh (WONG; REITER, 2009).

Na ausência do ligante, o receptor PTCH se localiza no cílio primário e reprime a atividade de SMO, impedindo a sua ativação e seu deslocamento para o interior do cílio. Na presença do SHH, o PTCH é deslocado para fora do cílio, permitindo a ativação de SMO e seu acúmulo no interior do cílio. O SMO ativado desencadeia uma cascata de sinalização que

resulta na ativação dos fatores de transcrição GLI a partir da liberação do complexo de proteínas inibidoras (supressor de fused (SUFU), Costal-2 (COS2) e Fused (FU)). Os fatores de transcrição GLI ativados são translocados para o núcleo, onde induzem a expressão de vários genes que regulam a proliferação, a diferenciação, a angiogênese e as interações extracelulares envolvidas no desenvolvimento e manutenção tumoral, tais como *CyclinD1*, *c-MYC*, *BCL2* e *SNAIL*. Além disso, outros genes alvo da via Hh constituem mecanismos de feedback positivo, como o *GLI1*, e feedback negativo, como *PTCH* e *HHIP*. (INGHAM; MCMAHON, 2001; RUIZ I ALTABA; SÁNCHEZ; DAHMANE, 2002; COHEN, 2003; MA; XIAO; HE, 2008; MIMÉAULT; BATRA, 2010; TZELEPI et al., 2011; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013) (FIGURA 1).

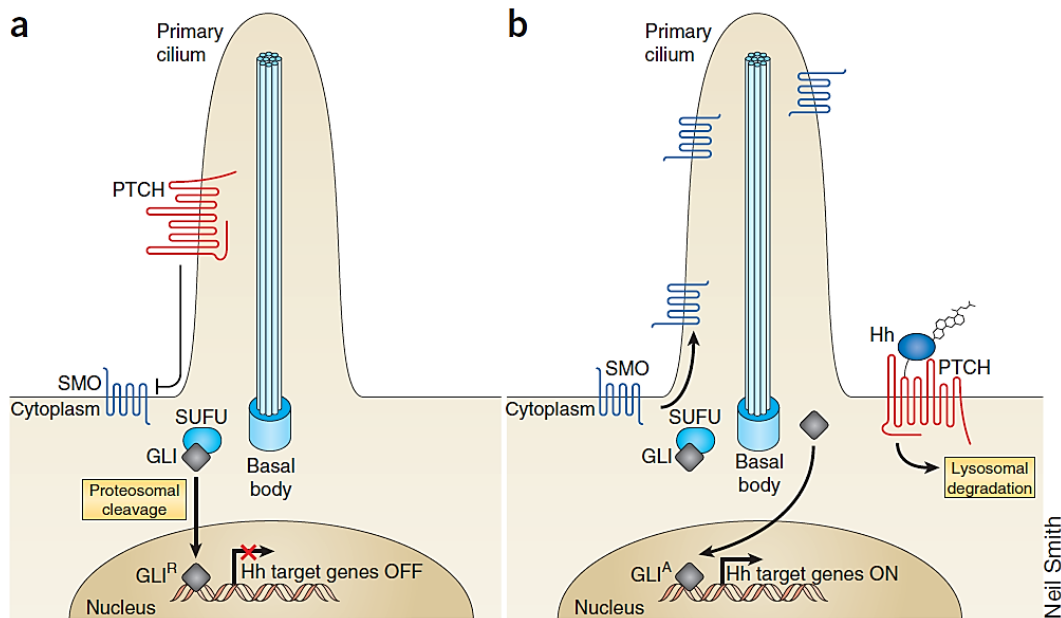


Figura 1: Desenho esquemático dos componentes da via Hh. Em (a) sem o ligante e em (B) com a presença do SHH (FONTE: AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013).

A ativação da via Hh induzida pela interação entre ligante-receptor é conhecida como via clássica. Porém, a via Hh pode se tornar ativa independente do ligante, a qual ocorre através de mecanismos de ativação posteriores ao SMO, sendo conhecida como via alternativa ou SMO-independente. Algumas possíveis causas para essa ativação independente de ligante são:

alterações genéticas, superexpressão de proteínas ciliares e interações com outras vias de sinalizações independentes (BLOTTA et al., 2012).

Os fatores de transcrição GLI1, GLI2 e GLI3 apresentam funções distintas. A função de repressor transcricional depende em grande parte do GLI3, enquanto que o papel de ativador transcricional é exercido pelo GLI2. Um dos alvos da via de sinalização Hh é a ativação do GLI1, que também atua como um ativador transcricional. Portanto, o GLI1 é utilizado como um indicador de ativação da via Hh (MERCHANT, 2012; YAN et al., 2013).

As proteínas SHH, SMO, GLI1 e GLI2 são reguladores positivos da via Hh, enquanto HHIP, SUFU, GLI3 e a família de receptores PTCH são reguladores negativos. Em uma variedade de tumores, a via Hh está ativada de forma aberrante, uma vez que reguladores positivos estão ativados e/ou reguladores negativos estão inativados (KATO; KATO, 2009).

Atualmente, estudos têm associado a via Hh com o desenvolvimento tumoral e têm evidenciado a ativação aberrante da via Hh em diversas neoplasias, como em carcinomas de mama (IM et al., 2013), esôfago (YANG et al., 2012a), pâncreas (HAO et al., 2013), fígado (CHENG et al., 2009), próstata (KIM et al., 2011) e tumores odontogênicos (GURGEL et al., 2014). Portanto, a inibição da via Hh, pode ser uma estratégia para o tratamento do câncer (MAS; RUIZ I ALTABA, 2010).

2.6 TRANSDUTOR DE SINAL E ATIVADOR DA TRANSCRIÇÃO 3 (STAT3)

STAT é uma família de fatores de transcrição citoplasmáticos latentes, que se ativam por meio de fosforilações (DARNELL, 1997). Mais de 40 ligantes diferentes podem causar a ativação da STAT, através de receptores de citocinas associados à Janus Quinase (JAK), receptores de fatores de crescimento tirosina quinase, receptores transmembrânicos acoplados a Proteína G, bem como *non*-receptor tirosina quinase (nRTKs) e interleucina 6 (GARCIA et

al., 1997; BROMBERG et al., 1999; SUBRAMANIAM et al., 2013). Atualmente, sete proteínas STATs (STAT1-4, 5a, 5b, e 6) foram identificadas (GAO et al., 2012).

A via Janus JAK-STAT foi identificada no início de 1990, como uma cascata de sinalização chave na mediação de sinais derivados de citocinas em mamíferos (DARNELL; KERR; STARK, 1994). Após ligação com o receptor, as citocinas induzem a dimerização do receptor e subsequente dimerização da JAK associada ao receptor. As JAKs autofosforilam-se e, em seguida, o complexo receptor-JAK fosforilado recruta e fosforila várias proteínas STATs. As STATs fosforiladas formam homodímeros ou heterodímeros via seus domínios Src e são translocadas para o núcleo, onde induzem a transcrição de genes alvos. Posteriormente, as STATs são inativadas por desfosforilação e retornam para o citoplasma (DARNELL; KERR; STARK, 1994; ZHONG; WEN; DARNELL, 1994; LEONARD; SHEA, 1998; YANG et al., 2012b; PANDURANGAN; ESA, 2014) (FIGURA 2).

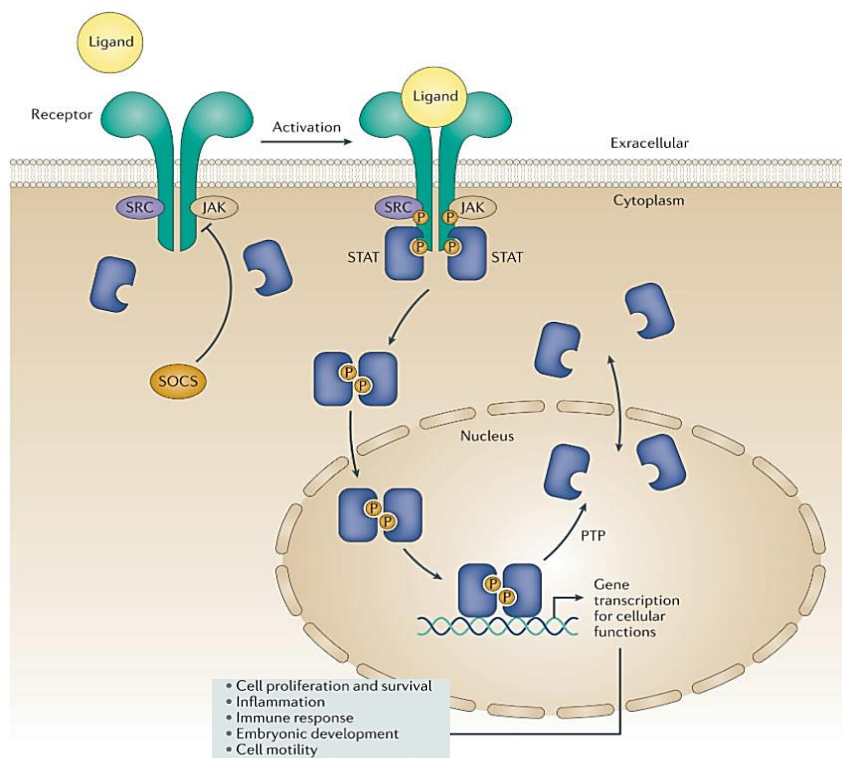


Figura 2: Desenho esquemático da ativação do STAT (FONTE: MIKLOSSY; HILLIARD; TURKSON, 2013).

A ativação de STAT-3 é regulada negativamente por vários mecanismos, dentre eles: os supressores de sinalização de citocinas (SOCS), o inibidor da STAT ativada (PIAS), as fosfatases e a degradação via proteossomo dependente de ubiquitina (AGGARWAL et al., 2009). As proteínas SOCS, se ligam ao sítio de ativação de JAK, bloqueando a fosforilação e ativação de STAT-3. Por outro lado, as PIAS são fatores nucleares capazes de interagir com a STAT-3 fosforilada e bloquear a transcrição (AGGARWAL et al., 2009; DEMARIA; CAMPOREALE; POLI, 2014).

Um número crescente de linhagens celulares derivadas de tumores, bem como amostras de neoplasias malignas, contêm proteínas STATs constitutivamente ativadas, mais freqüentemente o STAT3. A ativação inapropriada da STAT3 ou a inativação de reguladores negativos podem aumentar a proliferação e conduzir a transformação celular, favorecendo o desenvolvimento tumoral (BROMBERG et al., 1999; SONG et al., 2003; LI et al., 2007).

A ativação aberrante do STAT3 desencadeia a ativação de genes envolvidos em funções intrínsecas ao desenvolvimento tumoral, como: a diferenciação, expansão e sobrevivência de células tronco tumorais, a proliferação, regulação da apoptose e da resposta à hipóxia e ao metabolismo celular. Além disso, a via JAK-STAT3 também participa de aspectos referentes ao estroma tumoral, incluindo: angiogênese, sobrevivência de células endoteliais, infiltração de células imunológicas, a ativação de células mesenquimais e o desenvolvimento de metástase (YU; KORTYLEWSKI; PARDOLL, 2007; YU; PARDOLL; JOVE, 2009; BOURNAZOU; BROMBERG, 2013).

Estudos realizados em diversos tipos tumorais, como câncer de pulmão (SONG et al., 2003; LI et al., 2007; XU; LU, 2014), de mama (CHEN et al., 2013; CHUNG et al., 2014), de ovário (HAN et al., 2013), colorretal (LASSMANN et al., 2007; DOBI et al., 2013) e de glândula salivar (ARAÚJO et al., 2008; NIKITAKIS et al., 2009a, 2009b), têm demonstrado evidências apoiando o papel central da STAT3 no desenvolvimento tumoral.

2.7 VIA Hh E STAT3

Assim como a desregulação da via Hh, a ativação descontrolada da STAT3 também favorece o desenvolvimento tumoral (BROMBERG et al., 1999; SONG et al., 2003; LI et al., 2007; SUBRAMANIAM et al., 2013). Dessa forma, estudos têm sido realizados visando correlacionar a expressão de componentes da via Hh e STAT3 (LI et al., 2007; SENGUPTA et al., 2007; YANG et al., 2012b).

Sengupta et al. (2007) observaram em leucemia mielóide crônica, que a via de sinalização Hh induz a fosforilação e ativação do STAT3, uma vez ativo, o STAT3 induz a expressão de proteínas que auxiliam no desenvolvimento tumoral, como: Wnt3a, Lef1, Ciclina D1, p21 e GLI1. Porém, o mecanismo de ativação do STAT3 pela via de sinalização Hh ainda não foi identificado.

Outro estudo realizado por Li e colaboradores (2007) mostrou que a ativação persistente de STAT3 em camundongos transgênicos, desencadeia a inflamação e a tumorigênese espontânea no pulmão desses animais. Além disso, observou-se que alguns genes de desenvolvimento, como SHH e TTF-1, estão aumentados em pulmão de camundongos transgênicos que superexpressam STAT3. Com base nesses achados, outro estudo foi realizado por esse grupo. Na análise imunohistoquímica, observou-se a correlação entre o nível de expressão de STAT3 fosforilada e componentes da via Hh em adenocarcinomas de pulmão e em hiperplasia adenomatosa atípica, sugerindo uma relação entre essas duas vias. No entanto, após cotransfecção de STAT3 e SHH em células H441, não foi observada correlação direta entre essas vias. Porém, novos ensaios de cotransfecção demonstraram que o fator de transcrição TTF-1 atuou como um mediador entre STAT3 e a ativação dos genes da via Hh, sugerindo um mecanismo de regulação indireta (YANG et al., 2012b).

2.8 PROTEÍNA DE MANUTENÇÃO DO MINICROMOSSOMO 3 (MCM3)

A família de proteínas de manutenção do minicromossomo (MCM), composta por seis membros (MCM2-7), é um grupo de proteínas de ligação ao DNA que desempenha um papel importante na iniciação e regulação da replicação do DNA e na progressão do ciclo celular em células eucarióticas (FORSBURG, 2004; LEE et al., 2010; ASHKAVANDI et al., 2013).

A proteína MCM3 está fortemente envolvida na regulação da replicação do DNA, sendo expressa em células que estão em divisão, enquanto que em células quiescentes ocorre a perda de expressão. Portanto, as proteínas MCM3 são consideradas uma nova classe de marcadores de proliferação celular (MADINE et al., 2000; FORSBURG, 2004; DE ANDRADE et al., 2013).

Um estudo realizado por Endl et al. (2001) demonstrou que o anticorpo anti-MCM3 detecta células em proliferação, bem como as células que já cessaram a proliferação mas que não estão totalmente diferenciadas. Recentemente, Lameira e colaboradores (2014) realizaram um estudo em displasias orais e carcinoma escamocelular oral, sugeriram que o MCM3 pode ser um bom marcador de proliferação e diferenciação celular. Além disso, Ashkavandi e colaboradores (2013) analisaram a expressão imunoistoquímica do MCM3 em tumores benignos e malignos de glândula salivar, e concluíram que o MCM3 pode ser um novo marcador de proliferação em tumores de glândulas salivares, e ainda, que o MCM3 pode ser utilizado para o diagnóstico diferencial entre tumores de glândulas salivares.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os componentes da via Hh (SHH, HHIP, SUFU e GLI1), STAT3 e MCM3 em tumores de glândula salivar (adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermóide e carcinoma adenóide cístico).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a presença e localização de componentes da via Hh (SHH, HHIP, SUFU e GLI1), e semi-quantificar a expressão desses componentes em tumores de glândula salivar (adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermóide e carcinoma adenóide cístico).
- Identificar a presença e localização de STAT3, e semi-quantificar a expressão dessa proteína em tumores de glândula salivar em tumores de glândula salivar (adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermóide e carcinoma adenóide cístico).
- Identificar a presença e localização de MCM3, e semi-quantificar a expressão dessa proteína em tumores de glândula salivar (adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermóide e carcinoma adenóide cístico).
- Verificar se existe correlação entre a presença dos componentes da via Hh, o STAT3 e o MCM3 em tumores de glândula salivar (adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermóide e carcinoma adenóide cístico).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal descritivo de uma série de casos.

4.2 SELEÇÃO DOS CASOS

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE:33413414.0.0000.5024, Parecer: 784.874), foram utilizados 9 casos de adenoma pleomórfico, 20 casos de carcinoma mucoepidermóide e 17 casos de carcinoma adenóide cístico, obtidos dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), do Hospital Aristides Maltez (Salvador-Ba) e do Hospital AC Camargo (São Paulo-SP). Os dados clínicos referentes à idade, sexo, localização anatômica e tamanho da lesão foram obtidos a partir das fichas de exames anatomopatológicos (ANEXO 1).

Para análise histológica, cortes de 5 micrômetros (μm) de espessura foram obtidos dos espécimes fixados em formol e emblocados em parafina. As lâminas referentes a cada caso foram coradas em hematoxilina/eosina (H/E) e submetidas a novo exame histológico sob microscopia de luz. Todos os casos deste estudo foram enquadrados de acordo com os critérios da OMS (BARNES et al., 2005).

Em adição, também foram descritas e analisadas áreas de glândula salivar morfológicamente normal, localizadas adjacentes aos tumores.

4.3 TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

Para realização da técnica imunoistoquímica foram realizados cortes de $3\mu\text{m}$ de espessura, a partir do material embebido em formol e emblocados em parafina, sendo os cortes estendidos sobre lâminas de vidro previamente silanizadas. Foi utilizado o sistema EnVision

Advance® (*Dako Corporation, Carpinteria, USA*). Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram re-hidratados em dois banhos de álcool absoluto durante 5 minutos à temperatura ambiente.

Após lavagem em água corrente e dois banhos em água destilada, as lâminas receberam tratamento para recuperação antigênica em banho-maria. Após os cortes retornarem à temperatura ambiente, foram novamente lavados em água corrente, seguidos do bloqueio da peroxidase endógena tecidual, realizado em solução de peróxido de hidrogênio a 3% e água destilada, por 10 minutos, protegido da luz.

Repetida a lavagem em água corrente e água destilada, as lâminas foram imersas em três banhos sequenciais: solução de TRIS HCl por 5 minutos, solução de TRIS-TRITON por 5 minutos e água destilada por 5 minutos. Em seguida, os anticorpos foram diluídos com solução redutora de background (*Dako Corporation, Carpinteria, USA*), aplicados sobre os cortes e encubados por 18h (overnight) a 4°C (TABELA 1).

TABELA 1: Anticorpo, marca, clone, diluição recuperação antigênica e controle positivo.

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição	Recuperação Antigênica	Controle Positivo
Anti-SHH	Novus Biologicals	5H4	1:1000	Citrato pH 6,0	Placenta
Anti-HHIP	Sigma	policlonal	1:200	Citrato pH 6,0	Placenta
Anti-GLI1	Novus Biologicals	policlonal	1:600	Citrato pH 6,0	Placenta
Anti-SUFU	Santa Cruz	policlonal	1:100	Citrato pH 6,0	Placenta
Anti-STAT3	Santa Cruz	F-2	1:100	Citrato pH 6,0	Carcinoma Pulmonar
Anti-MCM3	Dako	101	1:50	EDTA ph 9,0	Carcinoma de Mama

Em seguida, as lâminas foram imersas em dois banhos de solução de TRIS-HCl durante 5 minutos cada, e, então, foi aplicado o sistema polimérico *EnVision Advance* (*Dako Corporation, Carpinteria, USA*), à temperatura ambiente, durante 20 minutos em HRP link e 20 minutos em HRP enzyme.

Esta etapa foi sucedida por nova imersão em solução de TRIS-HCl, como já descrito anteriormente. Para revelação da reação foi empregado o DAB (3,3'-diaminobenzidina, *Dako Corporation, Carpinteria, USA*) em câmara escura por 5 minutos. Em seguida, após nova lavagem em água destilada, as secções teciduais foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 5 minutos e novamente lavadas. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá.

Cada reação foi conferida com o respectivo controle (TABELA 1). Para o controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por solução de TRIS-HCl.

4.4 EXAME IMUNOISTOQUÍMICO

A análise das células marcadas positivamente foi realizada por dois observadores previamente calibrados, através de microscopia de luz de alta definição (AXIOSTARPLUS, ZEISS, Germany 2008).

Para o exame imunoistoquímico dos anticorpos SHH, HHIP, GLI1, SUFU e STAT3, os casos foram classificados de acordo com a intensidade e a proporção de marcação. A intensidade foi classificada em: escore 0 = sem coloração, escore 1 = coloração discreta, escore 2 = coloração moderada e escore 3 = coloração intensa. A proporção de marcação foi definida como a percentagem de células marcadas (0 = 0-10%, 1 = 11-25%, 2 = 26-50%, 3 = 51-75%, 4 = 76-100%). O índice de marcação (IM) foi calculado através da multiplicação da intensidade (0-3) pela proporção (de 0 a 4), como segue: $IM = \text{Intensidade de marcação} \times \text{Proporção de células marcadas}$. Em seguida, classificamos a expressão de proteínas por IM: negativo (-) para $IM=0$, baixa expressão (1+) para IM entre 1 e 4, alta expressão (2+) para IM entre 5 e 8, e superexpressão (3+) para IM entre 9 e 12 (adaptado de DULTRA et al., 2012; YAN et al., 2013; DONG et al., 2014; WEI et al., 2014) (ANEXO 2).

Para o MCM3, foi realizada a contagem manual das células marcadas positivamente e das células negativas, em aumento de 400x em 10 campos, e transferidas para um monitor de vídeo por um sistema computadorizado. Após a captura através de uma câmera digital (AXIOCAM ICc3, ZEISS, Germany 2008), os casos foram analisados utilizando-se de um software (IMAGEJ 1.48v, NIH Image, USA, 2014). Em seguida, foi feita uma porcentagem de células marcadas em relação ao total de células presentes por campo. Para possibilitar a comparação com os demais anticorpos, a porcentagem obtida através da contagem para o MCM3 foi classificada em escores, como descrito anteriormente (0 = 0-10%, 1 = 11-25%, 2 = 26-50%, 3 = 51-75%, 4 = 76-100%) e multiplicada pela intensidade de marcação.

Para todas as proteínas, foi realizada a análise da marcação estromal, utilizando o índice de marcação (IM), como descrito anteriormente.

Além disso, a marcação foi classificada de acordo com a sua localização: membranar e/ou citoplasmática para o SHH, HHIP e SUFU, nuclear e/ou citoplasmática para o STAT3 e GLI1, e nuclear para MCM3. Também foram descritos os tipos celulares positivamente marcados.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística das imunomarcações dos anticorpos (SHH, HHIP, SUFU, GLI1, STAT3 e MCM3) nos diferentes tipos tumorais (AP, CAC e CME) foi aplicado o teste Qui-quadrado. Em seguida, para possibilitar a comparação da imunomarcação entre dois grupos de tumores, os índices de marcação (IM) foram categorizados em dois grupos: alta imunexpressão (2+ e 3+) e baixa imunexpressão (- e 1+), e aplicado o teste exato de Fisher. Para correlação entre os componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 foi realizado o Coeficiente de correlação de Spearman. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 IMUNOMARCAÇÃO DE SHH

Em áreas de glândula salivar normal adjacentes ao tecido tumoral, houve marcação citoplasmática e granular das células ductais, enquanto que os ácinos serosos raramente apresentaram marcação (FIGURA 3A, B e C).

No AP, a maioria dos casos (n=8) apresentou superexpressão de SHH (TABELA 2). Observou-se marcação citoplasmática de células luminais e de algumas células mioepiteliais (FIGURA 3D, E e F). Notou-se ainda, marcação citoplasmática em áreas de metaplasia escamosa e em áreas condróides.

No CAC, o IM variou bastante entre os casos (TABELA 2). Observou-se marcação citoplasmática das células luminais do padrão tubular e em áreas cribriformes (FIGURA 3G, H e I). Em alguns casos, notou-se a marcação de glicoproteínas de membrana. Por vezes, observou-se marcação de vasos e fibroblastos.

No CME, grande parte dos casos apresentou alta expressão (n=9) e superexpressão (n=9) de SHH (TABELA 2). Houve marcação citoplasmática de células claras e epidermóides em áreas mais sólidas. Em áreas císticas, houve marcação de células epidermóides basais e parabasais (FIGURA 3J, L e M). Em um caso, observou-se áreas de marcação aberrante em núcleo. No estroma, observou-se marcação de células inflamatórias, folículos linfóides e fibroblastos.

5.2 IMUNOMARCAÇÃO DE GLI1

Em áreas de glândula salivar normal adjacentes ao tecido tumoral, observou-se marcação nuclear e citoplasmática de células ductais. Por vezes, observou-se marcação citoplasmática de ácinos serosos (FIGURA 4A).

No AP, a marcação nuclear de GLI1 variou entre baixa expressão (n=4) e superexpressão (n=3) (TABELA 2). Quando presente, a marcação nuclear foi observada em células mioepiteliais plasmocitóides e em células luminais, enquanto que as células mais externas dos ductos apresentaram marcação citoplasmática. Observou-se marcação nuclear em áreas de metaplasia escamosa. Por vezes, observou-se marcação de matriz extracelular (FIGURA 4B, C e D).

No CAC, um número elevado de casos apresentou superexpressão (n=9) de GLI1 nuclear (TABELA 2). A marcação foi nuclear em células luminais de áreas tubulares e em áreas cribriiformes. Por vezes, observou-se marcação nuclear de células angulares. Raramente, foi observada discreta marcação de matriz extracelular (FIGURA 4E, F e G).

No CME, houve um predomínio de alta expressão e superexpressão (n=15) para GLI1 nuclear (TABELA 2). A marcação foi nuclear e granular para células claras em áreas mais sólidas. Em áreas císticas, observou-se um predomínio de marcação nuclear de células basais e parabasais, bem como a marcação nuclear de células caliciformes. No estroma tumoral, notou-se a marcação de alguns vasos sanguíneos e fibroblastos (FIGURA 4H, I e J).

5.3 IMUNOMARCAÇÃO DE SUFU

Em áreas de glândula salivar normal adjacentes ao tecido tumoral, observou-se marcação citoplasmática de células ductais, e ausência de marcação nos ácinos serosos (FIGURA 5A).

No AP, os IMs variaram entre alta expressão (n=4) e superexpressão (n=4) de SUFU (TABELA 2). Houve marcação citoplasmática de células luminais e de células mioepiteliais plasmocitóides. Observou-se marcação citoplasmática em áreas de metaplasia escamosa e em áreas condróides. No estroma, ocorreu marcação celular e da matriz (FIGURA 5B, C e D).

No CAC, o IM para o SUFU foi bastante variado entre os casos (TABELA 2). Observou-se marcação citoplasmática das células luminais em áreas tubulares e cribriformes. Notou-se, também, marcação estromal (FIGURA 5E, F e G).

No CME, houve um predomínio de alta expressão (n=8) de SUFU (TABELA 2). Observou-se marcação citoplasmática de células epidermóides e de células claras em áreas sólidas. E em áreas císticas houve marcação de células epidermóides basais e parabasais. No estroma, notou-se a marcação de células inflamatórias e fibroblastos (FIGURA 5H, I e J).

5.4 IMUNOMARCAÇÃO DE HHIP

Em áreas de glândula salivar normal adjacentes ao tecido tumoral, observou-se marcação citoplasmática de células ductais e ausência de marcação nos ácinos serosos (FIGURA 6A).

No AP, observou-se IMs variados, desde negativo até superexpressão de HHIP (TABELA 2). Houve marcação citoplasmática de células luminais e de células mioepiteliais plasmocitóides. Observou-se marcação citoplasmática de células com diferenciação condróide e em áreas de metaplasia escamosa. Em áreas mixóides, notou-se marcação citoplasmática de células na matriz (FIGURA 6B, C e D).

No CAC, grande parte dos casos apresentou superexpressão (n=10) de HHIP (TABELA 2). A marcação foi citoplasmática e granular. Observou-se também marcação estromal (FIGURA 6E, F e G).

No CME, a maioria dos casos apresentou alta expressão (n=9) de HHIP (TABELA 2). Ocorreu um predomínio da marcação citoplasmática de células claras, de células intermediárias e de células epidermóides. Houve ainda marcação de células basais e suprabasais de áreas císticas. No estroma, observou-se marcação de fibroblastos e vasos sanguíneos (FIGURA 6H, I e J).

5.5 IMUNOMARCAÇÃO DE STAT3

Em áreas de glândula salivar normal adjacentes ao tecido tumoral, raramente houve marcação das células ductais, e quando presente, esta foi citoplasmática (FIGURA 7A).

No AP, todos os casos foram negativos (n=9) para marcação nuclear de STAT3 (TABELA 2). Quando presente, a marcação foi citoplasmática de células mioepiteliais plasmocitóides e células luminais. Não foi observada marcação em áreas de metaplasia escamosa. A matriz extracelular não apresentou marcação (FIGURA 7B e C).

No CAC, muitos casos apresentaram alta expressão (n=8) para o STAT3 nuclear (TABELA 2). A marcação foi predominantemente nuclear em áreas sólidas e de células mais internas do padrão tubular e cribriforme. Não foi observada marcação de matriz extracelular (FIGURA 7D e E).

No CME, houve um predomínio de casos negativos (n=18) para o STAT3 nuclear (TABELA 2). Contudo, grande parte dos casos apresentou marcação citoplasmática de células epidermóides e de células claras em áreas mais sólidas. E em áreas císticas, observou-se marcação citoplasmática de células basais, suprabasais e de células próximas ao lúmen (FIGURA 7F e G). Células caliciformes também apresentaram marcação. Observou-se marcação de células inflamatórias.

5.6 IMUNOMARCAÇÃO DE MCM3

Em áreas de glândula salivar normal adjacentes ao tecido tumoral, não foi observada marcação para o MCM3 (FIGURA 8A).

No AP, a maioria dos casos foi negativa (n=6) para a marcação nuclear de MCM3 (TABELA 2). Quando presente, a marcação foi em células mioepiteliais plasmocitóides e em células luminais de alguns ductos. Não houve marcação de matriz extracelular (FIGURA 8B).

No CAC, um número elevado de casos apresentou alta expressão (n=8) nuclear de MCM3 (TABELA 2). A marcação foi observada em células luminais de áreas tubulares e cribriformes. Não foi observada marcação de matriz extracelular (FIGURA 8C).

No CME, houve um predomínio de casos negativos (n=12) para o MCM3 (TABELA 2). Quando presente, a marcação foi em células claras em áreas mais sólidas. Em áreas císticas, observou-se um a marcação de células basais e parabasais. Na matriz extracelular, não foi observada marcação (FIGURA 8D).

Tabela 2: Índices de marcação (IM) dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 nos tumores de glândula salivar.

	SHH				GLI				SUFU			
	-	+1	+2	+3	-	+1	+2	+3	-	+1	+2	+3
AP (n=9)	0	1	0	8	1	4	1	3	0	1	4	4
CAC (n=17)	3	6	3	5	0	3	5	9	2	5	3	4
CME (n=20)	0	2	9	9	2	3	10	5	0	1	8	2

	HHIP				STAT3				MCM3			
	-	+1	+2	+3	-	+1	+2	+3	-	+1	+2	+3
AP (n=9)	2	3	3	1	9	0	0	0	6	3	0	0
CAC (n=17)	3	2	2	10	4	4	8	1	5	4	8	0
CME (n=20)	3	3	9	5	18	0	1	1	12	6	1	1

(- = negativo; +1 = baixa expressão; +2 = alta expressão; +3 = superexpressão)

SHH

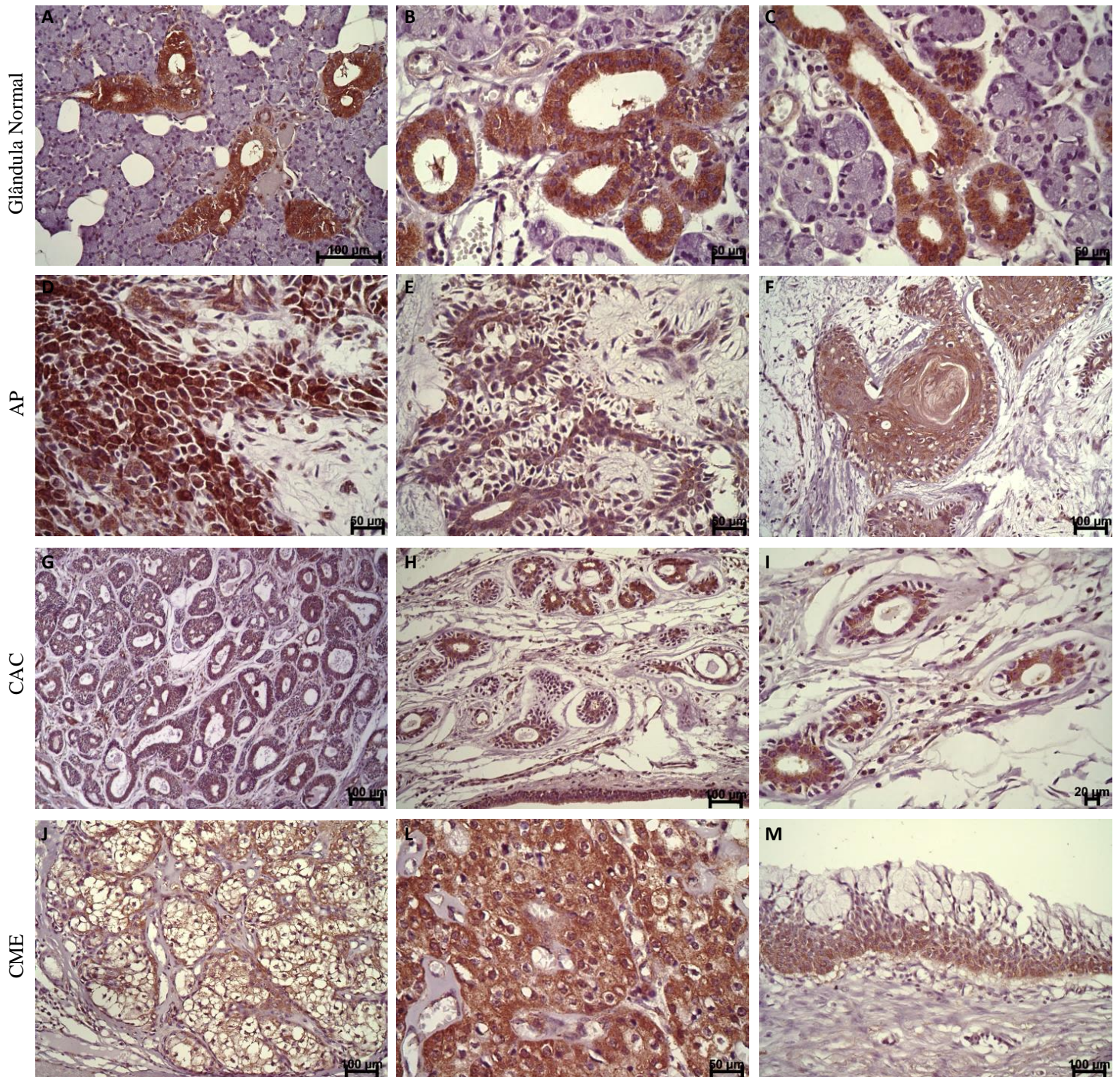


Figura 3: Imunomarcação de SHH. Glândula salivar normal: (A, B e C) Marca o citoplasmática de células ductais glandulares; observar ausência de marca o nos ácinos serosos. Adenoma Pleomórfico: (D) Forte marca o em células mioepiteliais, (E) em células luminais de estruturas ductais e (F) em áreas de metaplasia escamosa. Carcinoma Adenóide Cístico: (G) Marca o citoplasmática no padrão tubular, (H e I) em células luminais das estruturas tubulares. Carcinoma mucoepidermóide: (J) Discreta marca o citoplasmática de células claras, (L) forte marca o de células intermediárias e (M) marca o citoplasmática de células escamóides em espaço cístico.

GLI1

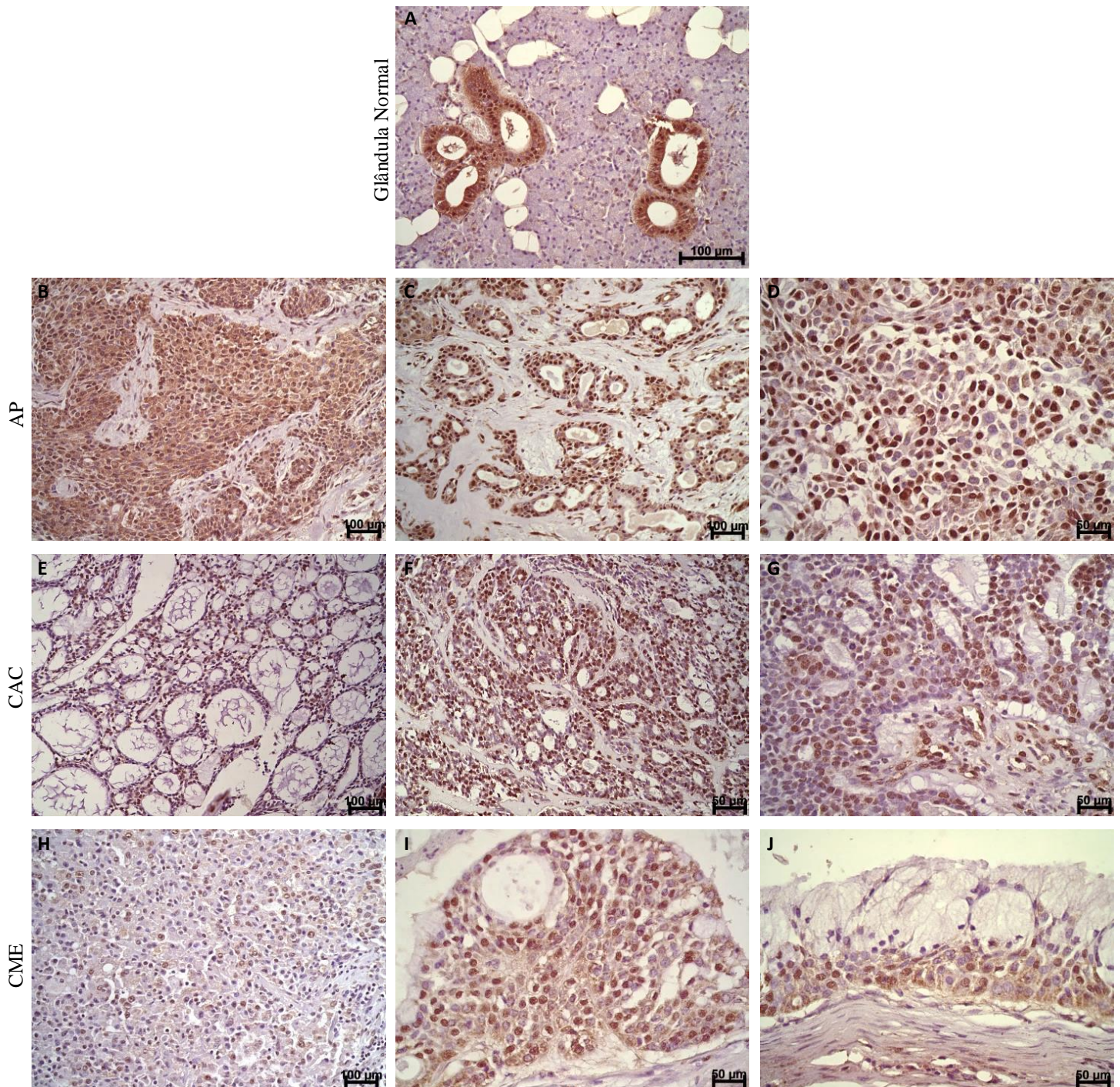


Figura 4: Imunomarcção de GLI1. Glândula salivar normal: (A) Marcação predominantemente nuclear de células ductais glandulares; observar ausência de marcação nos ácinos serosos. Adenoma Pleomórfico: (B) Lençol de células mioepiteliais exibindo marcação predominantemente citoplasmática, (C) células ductais com predomínio de marcação nuclear e (D) marcação nuclear das células mioepiteliais. Carcinoma Adenóide Cístico: (E e F) Marcação nuclear em áreas cribriformes do CAC e (G) em área mais sólida. Carcinoma Mucoepidermóide: (H) Marcação nuclear em área sólida no CME, (I) em células intermediárias e (J) em células escamóides em espaço cístico.

SUFU

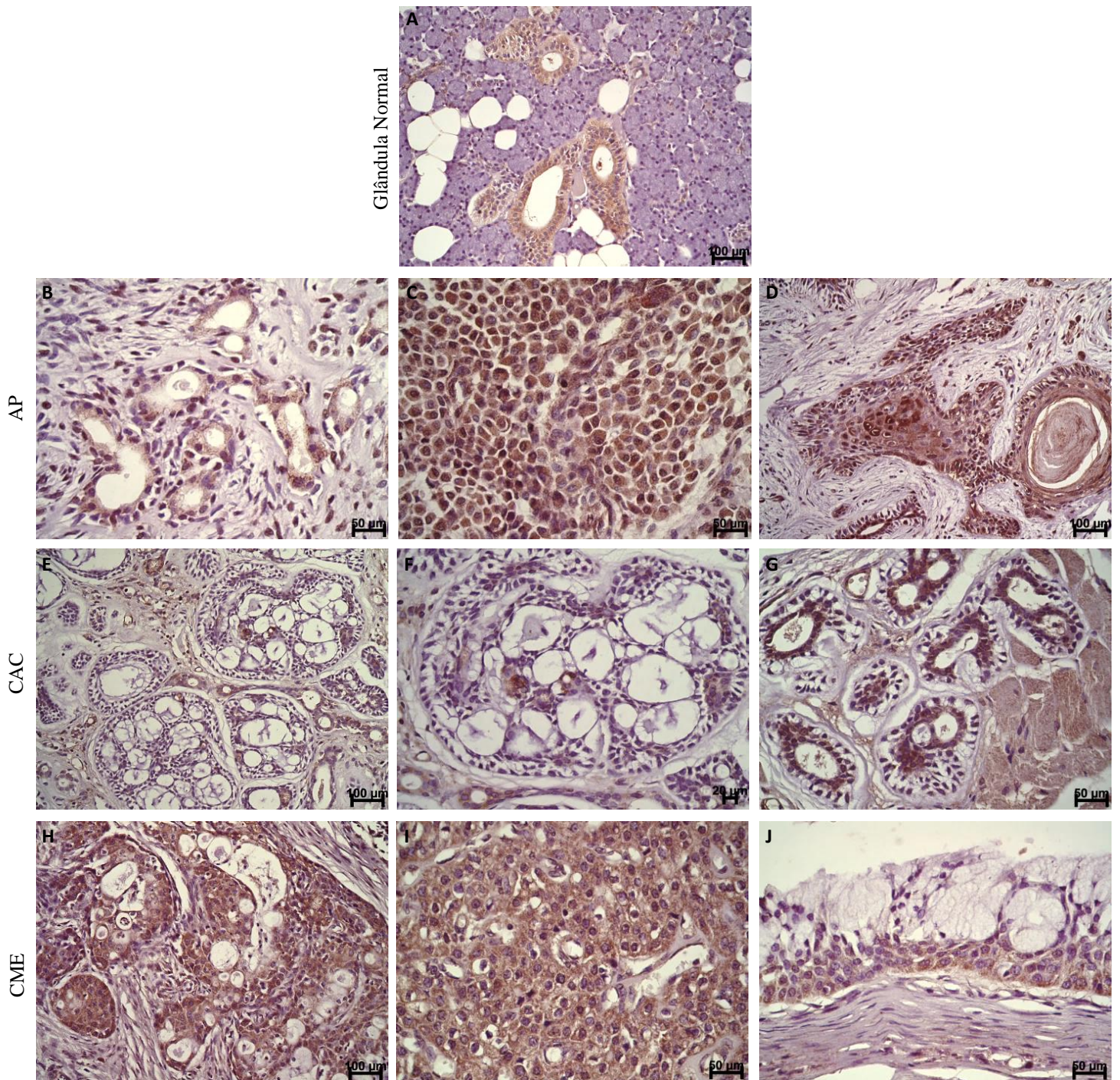


Figura 5: Imunomarcação de SUFU. Glândula salivar normal: (A) Marcação citoplasmática de células ductais glandulares; observar ausência de marcação nos ácinos serosos. Adenoma Pleomórfico: (B) Marcação citoplasmática em células luminiais de estruturas ductais, (C) em células mioepiteliais e (D) em áreas de metaplasia escamosa. Carcinoma Adenóide Cístico: (E) Padrão cribriforme com pequenos lúmens imunopositivos, (F) detalhe da figura anterior, (G) marcação citoplasmática em células luminiais de estruturas ductais. Carcinoma Mucoepidermóide: (H) Marcação citoplasmática de células epidermóides, (I) de células intermediárias e (J) de células escamóides em espaço cístico.

HHIP

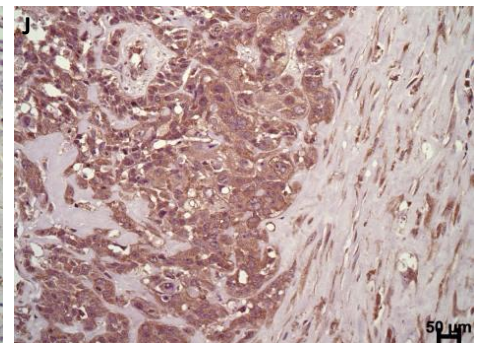
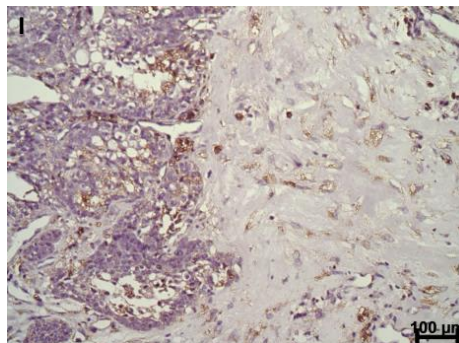
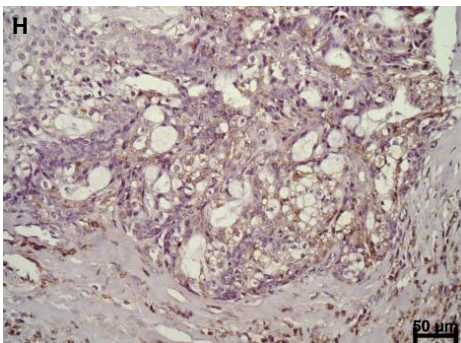
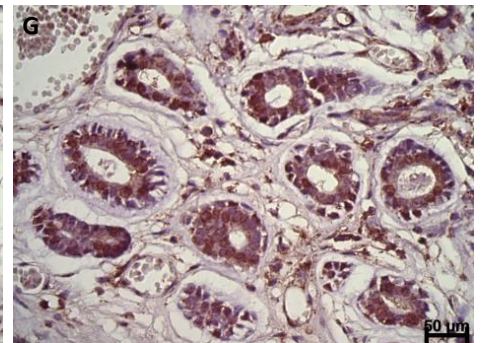
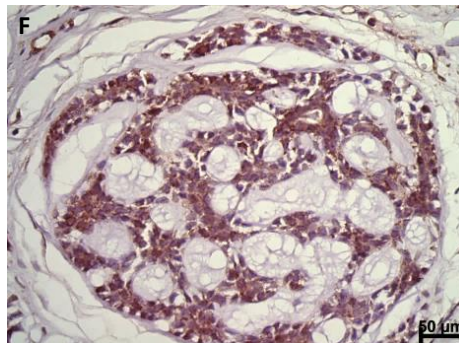
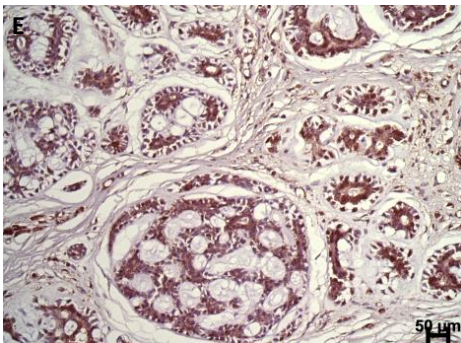
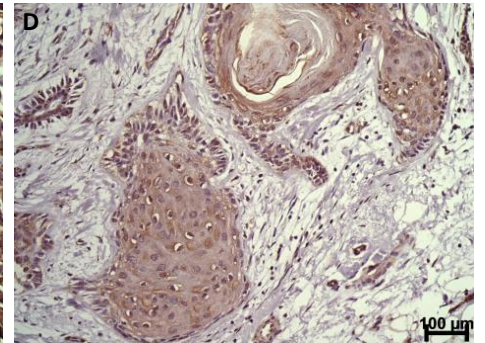
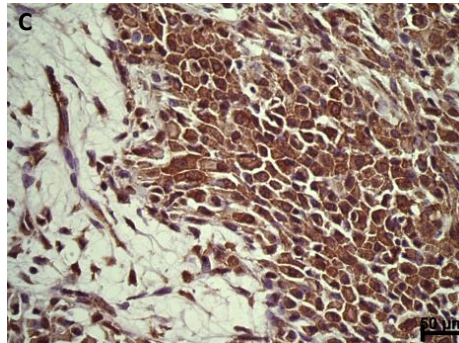
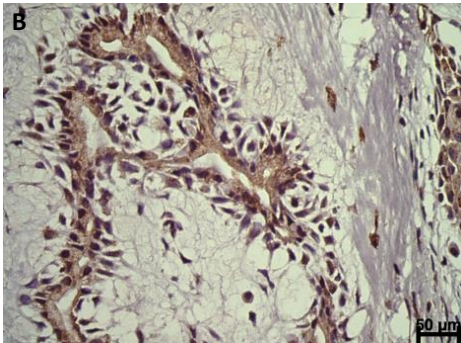
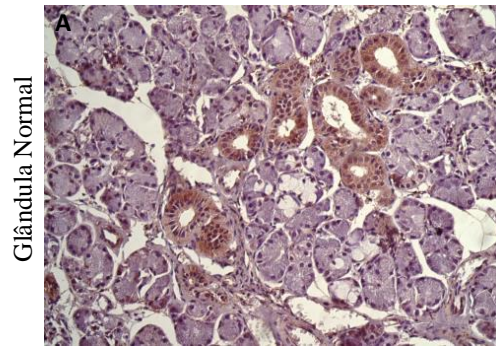


Figura 6: Imunomarcção de HHIP. Glândula salivar normal: (A) Marcação citoplasmática de células ductais glandulares; observar ausência de marcação nos ácinos serosos. Adenoma Pleomórfico: (B) Marcação citoplasmática de células luminiais em padrão túbulo-trabecular; observar matriz mixóide com células imunopositivas, (C) marcação citoplasmática de células mioepiteliais e (D) discreta marcação em áreas de metaplasia escamosa. Carcinoma Adenóide Cístico: (E) Marcação citoplasmática de áreas cribriformes e tubulares, (F) detalhe da figura anterior, mostrando marcação citoplasmática em arranjo cribriforme. (G) Detalhe da figura E, padrão tubular com células imunomarcadas. Carcinoma Mucoepidermóide: (H) Marcação citoplasmática discreta de células claras. (I) Área cística com discreta marcação citoplasmática de células epidermóides e intermediárias. (J) marcação citoplasmática de células epidermóides. (H, I e J) Observar estroma fibroso contendo células imunomarcadas.

STAT3

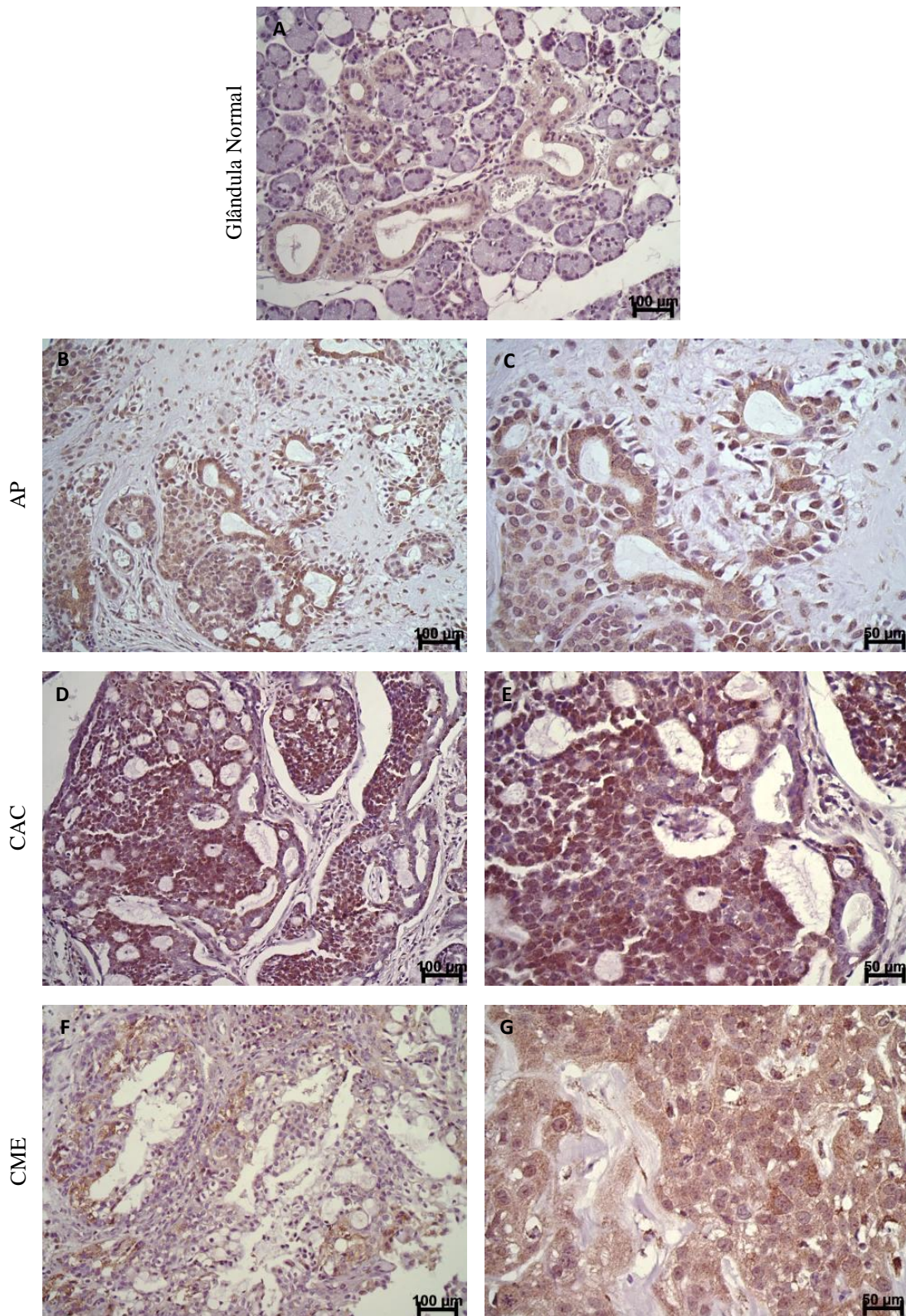


Figura 7: Imunomarcação de STAT3. Glândula salivar normal: (A) Discreta marcação citoplasmática de células ductais glandulares; observar ausência de marcação nos ácinos serosos. Adenoma Pleomórfico: (B) Marcação citoplasmática de células luminiais de estruturas ductais e de células mioepiteliais, (C) observar detalhes. Carcinoma Adenóide Cístico: (D) Marcação nuclear em áreas cribriformes, (E) observar detalhes. Carcinoma Mucoepidermóide: (F) Área sólida com marcação citoplasmática, (G) Área sólida com predomínio de células epidermóides imunomarcadas.

MCM3

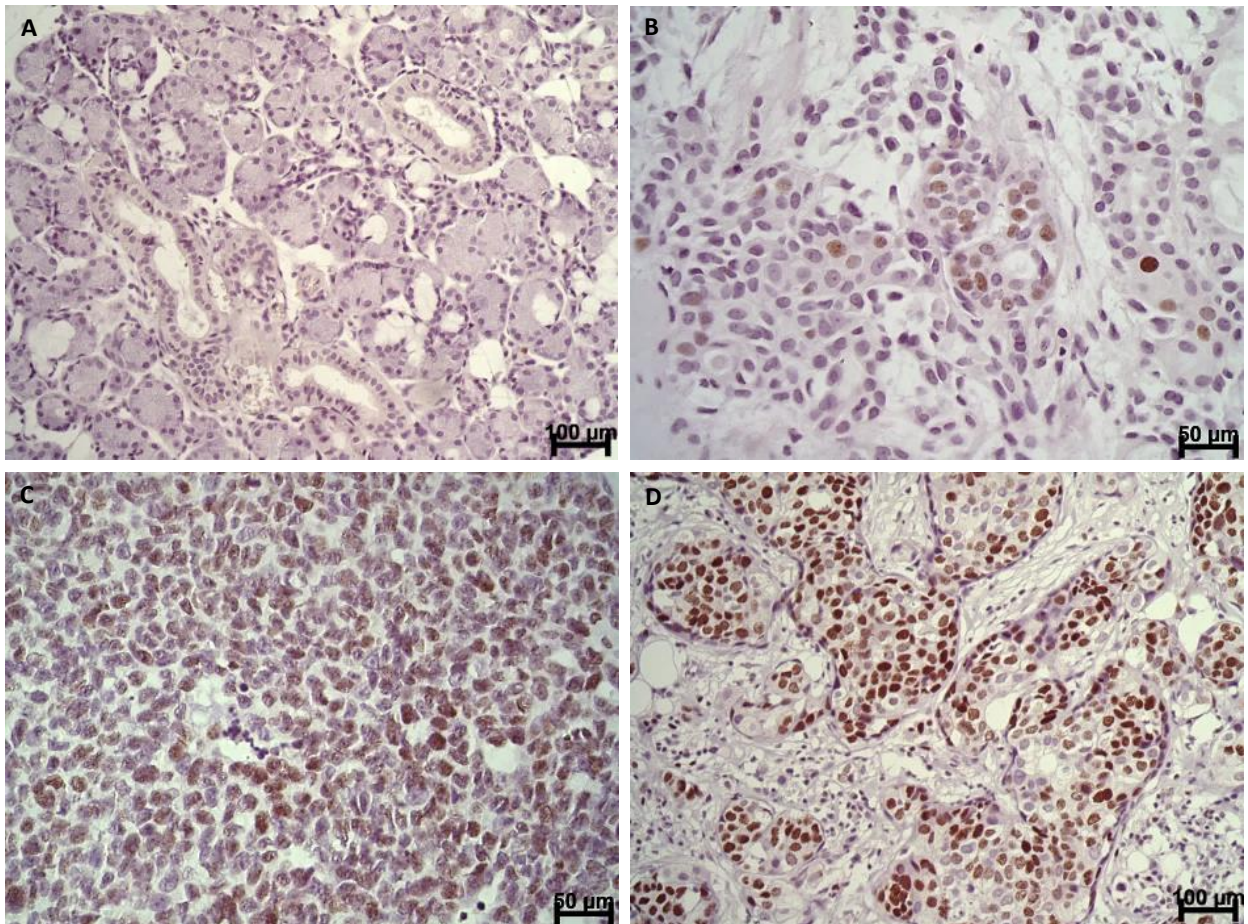


Figura 8: Imunomarcção de MCM3. Glândula salivar normal: (A) Ausência de marcação. Adenoma Pleomórfico: (B) Acúmulo focal de marcação nuclear de células mioepiteliais. Carcinoma Adenóide Cístico: (C) Marcação nuclear em área sólida. Carcinoma Mucoepidermóide: (D) Marcação nuclear em área sólida.

5.7 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE COMPONENTES DA VIA HH, STAT3 E MCM3 ENTRE OS TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR

Quando comparada a expressão dos componentes da via Hh entre os três tipos tumorais estudados, observou-se uma alta imunopressão de SHH no CME (n=18), sendo essa diferença estatisticamente significativa (Teste Qui-Quadrado) (TABELA 3).

Para o GLI1, foi observada uma alta imunopressão na maioria dos casos de CAC (n=14) e CME (n=15), e uma baixa imunopressão na maioria dos casos de AP (n=5), porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Teste Qui-Quadrado) (TABELA 3).

Para o SUFU, observou-se alta expressão na maioria dos casos de AP (n=8) e de CME (n=10), enquanto o CAC apresentou o mesmo número de casos de alta (n=7) e baixa (n=7) imunopressão, contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Teste Qui-Quadrado) (TABELA 3).

Por fim, observou-se alta imunopressão de HHIP nos casos de CAC (n=12) e CME (n=14), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Teste Qui-Quadrado) (TABELA 3). Os dados comparativos de imunopressão dos componentes da via Hh entre os tumores de glândula salivar estão representados na Figura 9.

Ao comparar a imunopressão do STAT3 nos três tipos tumorais, observou-se uma alta imunopressão nos casos de CAC (n=9) e baixa imunopressão nos casos de AP (n=9) e CME (n=18) (FIGURA 10), essa diferença foi estatisticamente significativa (Teste Qui-Quadrado) (TABELA 3).

Para o MCM3, observou-se uma alta imunopressão na metade dos casos de CAC (n=8) e baixa imunopressão em todos os casos de AP (n=9) e na maioria dos casos de CME (n=18) (FIGURA 11), e essa diferença foi estatisticamente significativa (Teste Qui-Quadrado) (TABELA 3).

Tabela 3: Relação da expressão dos componentes da via Hh, do STAT3 e do MCM3 entre os tumores de glândula salivar.

	AP	CAC	CME	p Valor
SHH				
Baixa Expressão	1	9	2	0.0064*
Alta Expressão	8	8	18	
GLI				
Baixa Expressão	5	3	5	0.0525**
Alta Expressão	4	14	15	
SUFU				
Baixa Expressão	1	7	1	0.1106
Alta Expressão	8	7	10	
HHIP				
Baixa Expressão	5	5	6	0.1218
Alta Expressão	4	12	14	
STAT3				
Baixa Expressão	9	8	18	0.0003*
Alta Expressão	0	9	2	
MCM3				
Baixa Expressão	9	9	18	0.0257*
Alta Expressão	0	8	2	

*Estatisticamente significante ($p < 0.05$).

**Tendência.

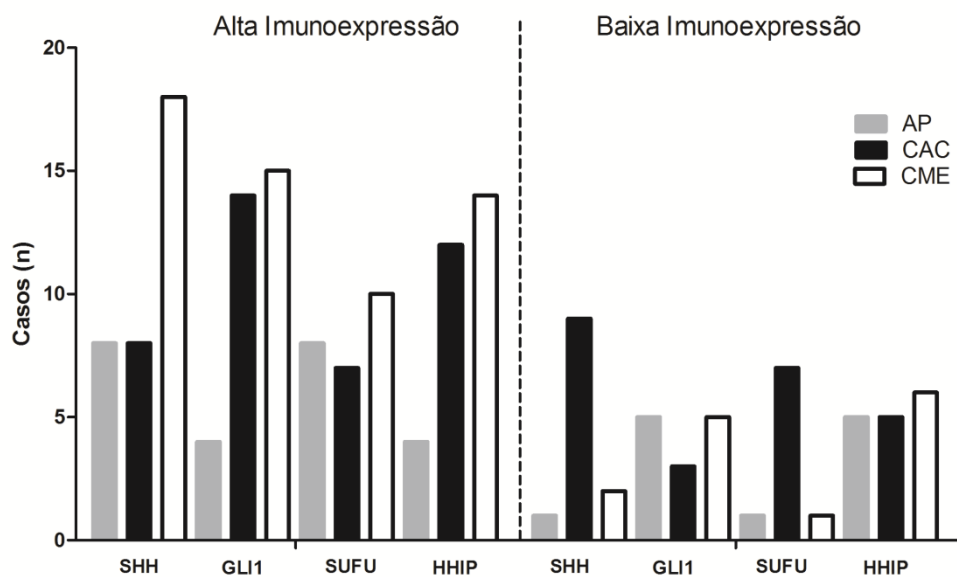


Figura 9: Número de casos com alta e baixa imunoexpressão de componentes da via Hh nos diferentes tumores de glândula salivar.

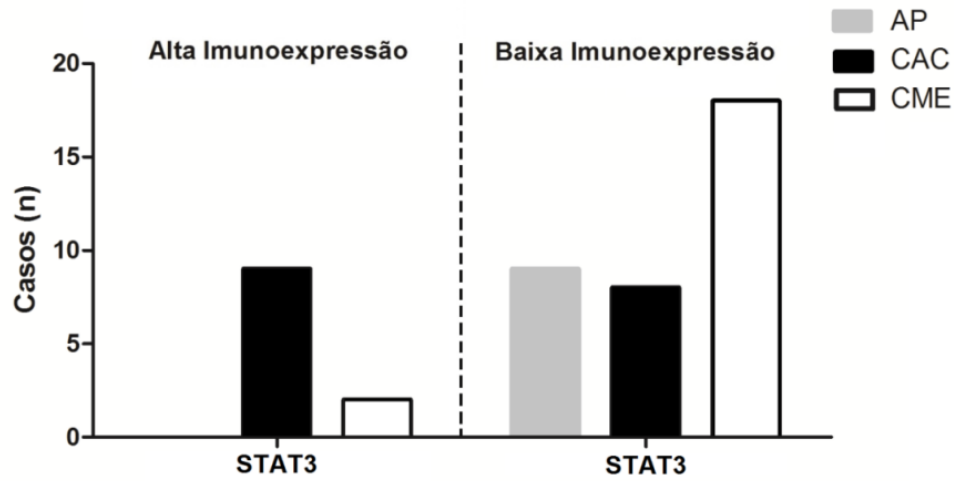


Figura 10: Número de casos com alta e baixa imunoexpressão de STAT3 nos diferentes tumores de glândula salivar.

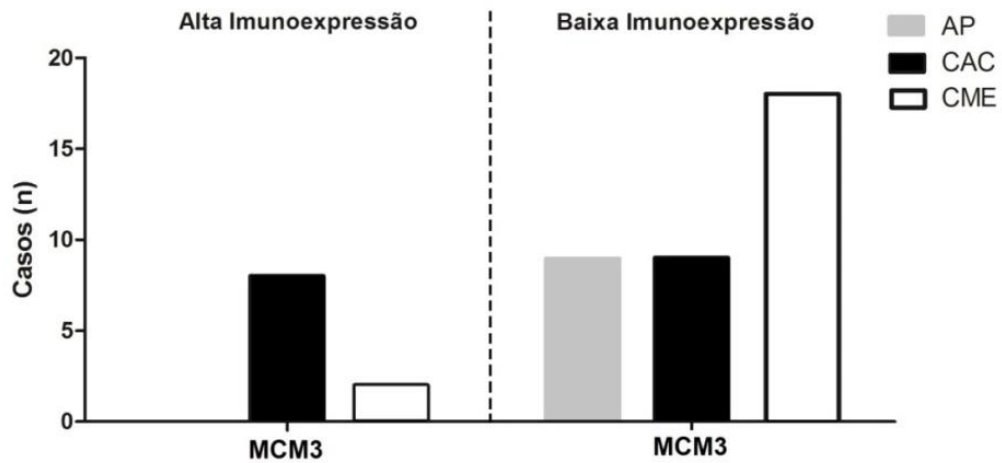


Figura 11: Número de casos com alta e baixa imunoexpressão do MCM3 nos diferentes tumores de glândula salivar

Por fim, foram comparadas as imunomarcações de dois tipos tumorais entre si, utilizando o Teste Exato de Fisher, e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Comparação da expressão de componentes da via Hh, do STAT3 e do MCM3 entre dois diferentes tipos de tumores de glândula salivar.

Marcador	Comparação	p Valor
SHH	AP/CAC	0.0873
	AP/CME	1.0000
	CAC/CME	0.0097*
GLI	AP/CAC	0.0781
	AP/CME	0.2047
	CAC/CME	0.7013
SUFU	AP/CAC	0.0858
	AP/CME	1.0000
	CAC/CME	0.0421*
HHIP	AP/CAC	0.2341
	AP/CME	0.2371
	CAC/CME	1.0000
STAT3	AP/CAC	0.0094*
	AP/CME	1.0000
	CAC/CME	0.0298*
MCM3	AP/CAC	0.0234*
	AP/CME	1.0000
	CAC/CME	0.0233*

*Estatisticamente significante ($p < 0.05$).

5.8 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA HH, DO STAT3 E DO MCM3 ENTRE OS DIFERENTES GRAUS HISTOLÓGICOS DO CME.

Foram analisados 20 casos de CME, destes, 5 eram de baixo grau, 5 de grau intermediário e 10 de alto grau. No entanto, as diferenças encontradas entre a expressão dos componentes da via Hh, do STAT3 e do MCM3 nos diferentes graus histológicos do CME não foram estatisticamente significante (Teste Qui-Quadrado) (TABELA 5).

Os tumores de baixo grau apresentaram menores IMs para o SHH, GLI1 e MCM3, enquanto que para SUFU e HHIP os IMs foram maiores (FIGURA 12).

Observou-se que os tumores de grau intermediário apresentaram IMs elevados para SHH e GLI1. Por outro lado, para SUFU e HHIP, os IMs variaram desde negativo até superexpressão. Para STAT3 e MCM3, os IMs foram negativos (FIGURA 12).

Os tumores de alto grau apresentaram IMs elevados para SHH, GLI1 e HHIP. Já para o STAT3, a maioria dos casos foi negativa (n=9). Quando comparado com os demais graus, os casos de alto grau foram os que apresentaram mais marcação para MCM3 (n=5) (FIGURA 12).

Tabela 5: Comparação dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 entre os três graus histológicos do CME.

Comparação	Marcador	P Valor
Baixo/Intermediário/Alto	SHH	0.8309
	GLI1	0.3352
	SUFU	0.5883
	HHIP	0.2582
	STAT3	0.8302
	MCM3	0.4242

*Estatisticamente significante (p<0.05)

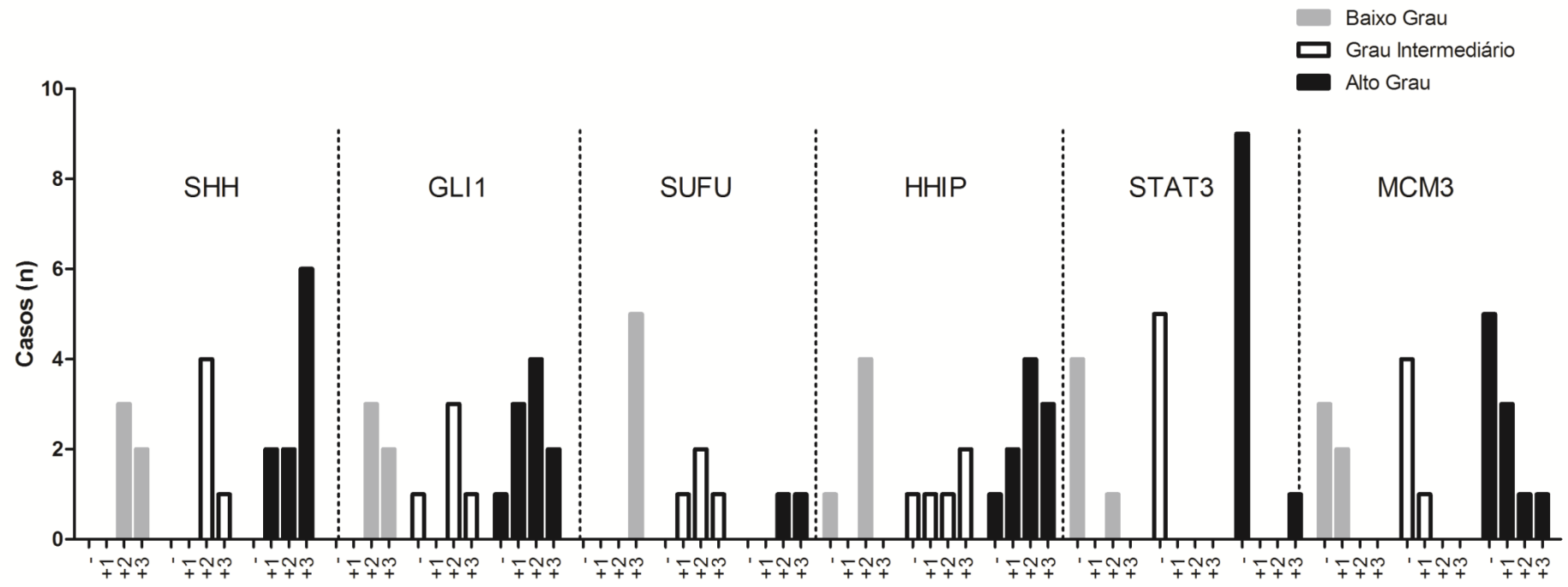


Figura 12: Índice de marcação (IM) dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 nos diferentes graus do CME.

5.9 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA HH, DO STAT3 E DO MCM3 ENTRE OS DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DO CAC.

Foram estudados 17 casos de CAC, destes, 10 eram do tipo cribriforme, 1 do tipo tubular e 6 do tipo sólido. No entanto, as diferenças encontradas na expressão dos componentes da via Hh, do STAT3 e do MCM3 entre os subtipos cribriforme e sólido não foram estatisticamente significante (Teste exato de Fisher) (TABELA 6).

Os 6 casos do tipo sólido apresentaram alta expressão (n=6) de GLI1. Para os demais marcadores (SHH, HHIP, SUFU, STAT3 e MCM3), observou-se índices de marcação variados, desde negativo até superexpressão.

Para a variante cribriforme, a maioria dos casos (n=7) apresentaram alta expressão para GLI1 e para HHIP, para os demais marcadores (SHH, HHIP, SUFU, STAT3 e MCM3), observou-se índices de marcação variados.

Tabela 6: Comparação dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 entre os tipos histológicos do CAC.

	Cribriforme (n)	Sólido (n)	p Valor
SHH			
Baixa Expressão	5	4	0.6329
Alta Expressão	5	2	
GLI			
Baixa Expressão	3	0	0.25
Alta Expressão	7	6	
SUFU			
Baixa Expressão	5	1	1
Alta Expressão	5	3	
HHIP			
Baixa Expressão	3	2	1
Alta Expressão	7	4	
STAT3			
Baixa Expressão	5	3	1
Alta Expressão	5	3	
MCM3			
Baixa Expressão	7	2	0.3024
Alta Expressão	3	4	

*Estatisticamente significante.

5.10 CORRELAÇÃO ENTRE OS COMPONENTES DA VIA HH, STAT3 E MCM3

Ao realizar o teste de Correlação de Spearman, não foi observada nenhuma correlação estatisticamente significativa entre SHH/STAT3, GLI1/STAT3, SHH/GLI1 e MCM3/GLI1 nos tumores estudados (TABELA 6). Contudo, observou-se, no CAC e no CME, que quanto maior a imunexpressão de SHH, maior foi a imunexpressão de GLI1 (TABELA 7).

Tabela 7: Correlação entre os componentes da via Hh, STAT3 e MCM3.

	Spearman r	Valor p
SHH/STAT3		
AP	-0.5443	0.4167
CAC	-0.5000	0.4167
CME	-0.3333	0.7500
GLI1/STAT3		
AP	0.9428	0.0833
CAC	-0.3162	0.7500
CME	-0.3134	0.7500
SHH/GLI1		
AP	-0.05556	0.9167
CAC	0.2128	0.9167
CME	0.9487	0.0833
MCM3/GLI1		
AP	0.5000	0.4167
CAC	-0.4000	0.7500
CME	-0.9487	0.0833

*Estatisticamente significativa ($p < 0.05$)

5.10 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS COMPONENTES DA VIA HH, DO STAT3 E DO MCM3 NO PARÊNQUIMA E NO ESTROMA DOS DIFERENTES TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR.

Para os componentes da via Hh, observou-se uma baixa expressão de SHH, GLI1, SUFU e HHIP no estroma da maioria dos casos de AP, CAC e CME (TABELA 8) (FIGURA 13). Ao comparar a marcação parenquimal com a marcação estromal, observou-se uma alta expressão parenquimal e uma baixa expressão estromal para SHH, GLI1, SUFU e HHIP no CME, sendo essas diferenças estatisticamente significantes (Teste Exato de Fisher) (TABELA 8). No CAC, também foi observada alta expressão parenquimal e uma baixa expressão estromal para GLI1, SUFU e HHIP, sendo essas diferenças estatisticamente significantes (Teste Exato de Fisher) (TABELA 8). Por fim, no AP não foi observada diferença estatisticamente significativa para nenhum marcador, quando comparada as marcações parenquimal e estromal (Teste Exato de Fisher) (TABELA 8).

Tanto o STAT3 quanto o MCM3 não apresentaram marcação estromal em nenhum dos casos de AP, CAC e CME. Apenas alguns casos de CME apresentaram marcação de células inflamatórias para o STAT3.

Tabela 8: Comparação da expressão dos componentes da via Hh no parênquima e no estroma dos diferentes tumores de glândula salivar.

Marcador	Imunoexpressão	AP		p Valor	CAC		p Valor	CME		p Valor
		Parênquima	Estroma		Parênquima	Estroma		Parênquima	Estroma	
SHH	Alta	8	5	0.2941	8	1	0.0167	18	5	<0.0001*
	Baixa	1	4		9	16		2	15	
GLI1	Alta	4	1	0.2941	14	1	<0.0001*	15	7	0.0002*
	Baixa	5	8		3	16		5	13	
SUFU	Alta	8	4	0.1312	7	0	0.0058*	10	4	0.0237*
	Baixa	1	5		7	14		1	7	
HHIP	Alta	4	2	0.6199	12	3	0.0049*	14	5	0.0104*
	Baixa	5	7		5	14		6	15	

*Estatisticamente significante (p<0.05).

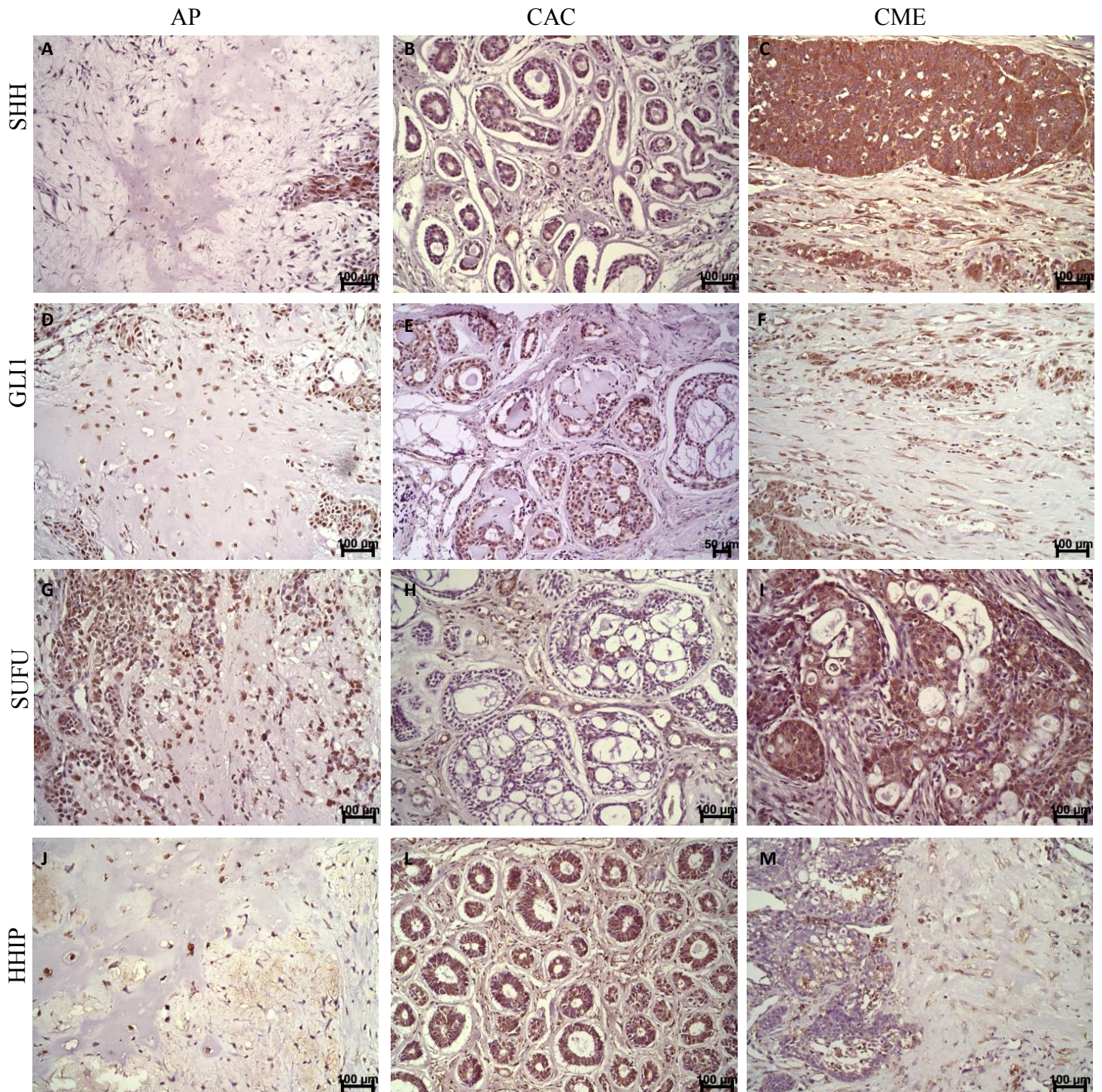


Figura 13: Imunomarcção em estroma. **SHH**. (A) Adenoma Pleomórfico. Estroma condróide exibindo discreta marcação celular. (B) Carcinoma Adenóide Cístico. Estroma pouco celularizado, negativo para SHH. (C) Carcinoma Mucoepidermóide. Estroma fibroso contendo células imunomarcadas. **GLI1**. (D) Adenoma pleomórfico. Estroma condróide com células imunomarcadas. (E) Carcinoma Adenóide Cístico. Estroma fibroso negativo para GLI1. (F) Carcinoma Mucoepidermóide. Estroma fibroso contendo células imuno **SUFU**. (G) Adenoma pleomórfico. Estroma mixóide com células imunomarcadas dispersas. (H) Carcinoma Adenóide Cístico. Estroma pouco celularizado, com discreta marcação de SUFU. (I) Carcinoma mucoepidermóide. Estroma fibroso com discreta marcação para SUFU. **HHIP**. (J) Adenoma Pleomórfico. Estroma condróide e mixóide contendo células imunomarcadas. (L) Carcinoma Adenóide Cístico. Estroma fibroso com células imunomarcadas. (M) Carcinoma mucoepidermóide. Estroma fibroso com discreta imunomarcção.

5.12 RELAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSIONE DOS COMPONENTES DA VIA HH, STAT3 E MCM3 E OS PARÂMETROS CLÍNICOS E INFLAMAÇÃO

Os dados da relação entre a imunoposição dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 e os parâmetros clínicos no AP, CAC e CME podem ser observados nas tabelas 9, 10 e 11, respectivamente. Vale ressaltar que para todos os parâmetros clínicos do AP e para alguns parâmetros de CAC e CME não foi possível a aplicação de testes para análise estatística devido ao tamanho da amostra.

No AP, observou-se uma maior expressão dos componentes da via Hh em pacientes com <40 anos e em tumores de glândula menor (TABELA 9).

No CAC, houve uma maior expressão dos componentes da via Hh, bem como STAT3 e MCM3 em casos com inflamação e invasão perineural, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (TABELA 10).

No CME, observou-se maior expressão dos componentes da via Hh em casos com inflamação e sem invasão perineural, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (TABELA 11).

Tabela 9: Relação entre a imunexpressão dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 e os parâmetros clínicos e inflamação dos casos de AP.

Marcador	SHH		GLI1		SUFU		HHIP		STAT3		MCM3	
	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa
Sexo												
M	4	1	3	2	4	1	1	4	0	5	0	5
F	3	0	1	2	3	0	2	1	0	3	0	3
Idade												
<40 anos	6	0	4	2	6	0	2	4	0	6	0	6
≥40 anos	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	0	2
Localização												
Glândula Maior	3	0	1	2	3	0	2	1	0	3	0	3
Glândula Menor	5	1	4	2	5	1	2	4	0	6	0	6
Tamanho												
<3 cm	3	1	3	1	3	1	3	1	0	4	0	4
≥3 cm	2	0	0	2	1	1	1	1	0	2	0	2
Inflamação												
Sim	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
Não	7	1	4	4	7	1	5	3	8	0	8	0

OBS. Devido o tamanho da amostra, não foi possível a realização da análise estatística.

Tabela 10: Relação entre a imunexpressão dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 e os parâmetros clínicos e inflamação dos casos de CAC.

Marcador	SHH			GLI1			SUFU			HHIP			STAT3			MCM3			
	Expressão	Alta	Baixa	P valor	Alta	Baixa	p valor	Alta	Baixa	P valor	Alta	Baixa	P valor	Alta	Baixa	P valor	Alta	Baixa	P valor
Sexo																			
M	2	8	-	2	8	-	6	1	-	7	3	-	3	7	-	5	5	-	
F	5	0	-	1	4	-	1	4	-	4	1	-	4	1	-	2	3	-	
Idade																			
<40 anos	4	2	-	4	2	-	2	3	-	5	1	-	4	2	-	2	4	-	
≥40 anos	3	6	-	8	1	-	3	4	-	6	3	-	3	6	-	5	4	-	
Localização																			
Glândula Maior	2	4	0.605	5	1	1.00	1	3	0.578	6	3	1.00	3	3	1.00	5	1	0.510	
Glândula Menor	5	4		7	2		4	4		7	3		4	5		2	7		
Tamanho																			
<3 cm	4	4	1.00	6	2	1.00	4	4	0.578	6	2	1.00	3	5	0.619	1	7	0.579	
≥3 cm	3	4		6	1		1	3		5	2		4	3		6	1		
Invasão																			
Perineural																			
Sim	5	6	1.00	10	1	0.5107	4	4	1.00	7	4	0.823	7	4	0.691	6	5	0.619	
Não	3	3		4	2		2	3		5	1		2	4		2	4		
Inflamação																			
Sim	5	6	1.00	9	2	1.00	4	4	1.00	7	4	0.823	7	4	0.691	6	5	0.619	
Não	3	3		4	1		3	3		5	1		5	1		2	4		

*Estatisticamente significante.

Tabela 11: Relação entre a imunoposição dos componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 e os parâmetros clínicos e inflamação dos casos de CME.

Marcador	SHH			GLI1			SUFU			HHIP			STAT3			MCM3			
	Expressão	Alta	Baixa	P valor	Alta	Baixa	p valor	Alta	Baixa	P valor	Alta	Baixa	P valor	Alta	Baixa	P valor	Alta	Baixa	P valor
Sexo																			
M	11	2		8	5		5	1		8	5		1	12		2	11		
F	6	0	-	6	0	-	4	0	-	5	1	-	0	6	-	0	6	-	
Idade																			
<40 anos	5	1		4	2		5	0		5	1		0	6		1	5		
≥40 anos	9	1	-	7	3	-	3	1	-	6	4	-	2	8	-	2	8	-	
Localização																			
Glândula Maior	8	1		6	3		5	0		6	3		0	9		0	9		
Glândula Menor	9	1	1.00	8	2	0.628	0	5	-	7	3	1.00	2	8	-	2	8	-	
Tamanho																			
<3 cm	5	1		4	2		2	0		5	1		1	5		1	5		
≥3 cm	11	1	1.00	10	2	0.567	7	0	-	8	4	0.614	1	11	1.00	1	11	1.00	
Invasão Perineural																			
Sim	4	2		5	1		1	0		4	2		1	5		2	4		
Não	14	0	-	10	4	1.00	9	1	-	10	4	1.00	11	12	0.357	0	14	-	
Inflamação																			
Sim	16	2		14	4		9	0		13	5		2	16		2	16		
Não	0	2	-	1	1	0.447	1	1	-	1	1	0.521	0	2	-	0	2	-	

*Estatisticamente significativa (p<0.05).

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram alta expressão de componentes da via Hh para a maioria dos casos de tumores de glândulas salivares aqui estudados, sugerindo que a via Hh participa do desenvolvimento desses tumores. Por outro lado, observou-se baixa expressão de MCM3 para a maioria dos casos estudados, enquanto que o STAT3 pareceu estar ativo apenas nos casos de CAC.

Em humanos, a via Hh participa ativamente do desenvolvimento embrionário de diversos órgãos (INGHAM; MCMAHON, 2001), incluindo as glândulas salivares (JASKOLL et al., 2004). Entretanto, em adultos, a via Hh encontra-se inativa (INGHAM; MCMAHON, 2001; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). A ativação clássica da via Hh se inicia quando a proteína SHH liga-se ao receptor PTCH1, inativando o efeito inibitório desse receptor sobre SMO, que desencadeia eventos intracelulares, resultando na ativação de fatores de transcrição da família GLI, o que induz a expressão de genes alvo, que regulam a proliferação, a diferenciação e as interações com a matriz extracelular (RUIZ I ALTABA; SÁNCHEZ; DAHMANE, 2002; COHEN, 2003; MA; XIAO; HE, 2008; TZELEPI et al., 2011; MERCHANT, 2012). Atualmente, estudos têm demonstrado a ativação aberrante da via Hh em diversas neoplasias (CHENG et al., 2009; YANG et al., 2012a; HAO et al., 2013; IM et al., 2013; GURGEL et al., 2014; HINTERSEHER et al., 2014; WAN et al., 2014). Porém, ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que destaca o papel da via Hh em tumores de glândula salivar.

No presente estudo, foi observada uma diferença estatisticamente significativa na expressão do ligante SHH entre os tumores estudados, verificando-se uma alta expressão para a maioria dos casos de AP e CME. Esses resultados foram similares aqueles encontrados por Xu et al. (2012) que também observaram uma alta expressão de componentes da via Hh para

tumores benignos e malignos de tireóide. Outros estudos também observaram alta expressão de SHH em tumores benignos, como adenomas gástricos (LEE et al., 2007), adenomas intestinais (ONISCU et al., 2004) e ameloblastomas (KANDA et al., 2013). Esses achados nos permitem sugerir que a via Hh pode estar ativa nos estágios iniciais de formação tumoral, participando assim, do desenvolvimento de neoplasias benignas e malignas de glândula salivar.

Por outro lado, alguns autores afirmam que o GLI1 é o indicador principal da ativação da via Hh (CHE et al., 2012; MERCHANT, 2012; YAN et al., 2013). No presente trabalho, observou-se uma alta expressão nuclear de GLI1 para a maioria dos casos de CME e CAC, e para alguns casos de AP, contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Xu et al., (2012), também observaram expressão de GLI1 em neoplasias benignas e malignas da tireóide, sendo maior a imunomarcagem nos tumores malignos. Wang et al. (2012) observaram alta expressão de GLI1 nuclear em carcinoma escamocelular de boca quando comparado com a mucosa normal, enquanto Kanda et al. (2013) detectaram a expressão nuclear de GLI1 em ameloblastomas. Portanto, é possível sugerir que a via Hh está ativa nos tumores aqui estudados, principalmente no CAC e no CME.

Apesar de grande parte dos casos de CAC apresentar baixa expressão de SHH, a maioria dos casos apresentou alta expressão nuclear de GLI1, o que nos permite sugerir que a via Hh está ativa no CAC, mas de uma forma independente do ligante SHH. A ativação da via Hh induzida pela interação entre ligante-receptor é conhecida como via clássica. Porém, a via Hh pode se tornar ativa independente do ligante, a qual ocorre através de mecanismos de ativação posteriores ao SMO, sendo conhecida como via alternativa ou SMO-independente. Algumas possíveis causas para essa ativação independente de ligante são: mutações genéticas, superexpressão de proteínas ciliares e interações com outras vias de sinalizações independentes (BLOTTA et al., 2012). Um estudo realizado em cultura de células e em camundongos, sugeriu que a via independente do ligante é mais importante para a morfogênese durante o

desenvolvimento da glândula mamária do que a via clássica (OKOLOWSKY; FURTH; HAMEL, 2014).

Um estudo realizado por Polizio et al. (2011) em cultura de células, demonstrou que a via Hh pode participar da migração celular sem a ativação dos fatores de transcrição GLI. Esses autores afirmam que a ativação de SMO desencadeia a ativação de quinases e GTPases que modulam a dinâmica de fosforilação do citoesqueleto. Concluiu-se que a ativação dos fatores de transcrição GLI é fundamental para a proliferação e manutenção celular, enquanto que a ativação de SMO pode auxiliar na migração celular independente de GLI. Portanto, sugerimos que novos estudos sejam realizados em tumores de glândula salivar para descrever o papel da via Hh na migração celular e metástase nesses tumores.

A proteína HHIP, descrita primeiramente em 1999, é uma glicoproteína de membrana com alta capacidade de ligação com os ligantes da via Hh (SHH, IHH e DHH), sendo um regulador negativo da via (CHUANG; MCMAHON, 1999; BOSANAC et al., 2009). Um estudo realizado por Olsen e colaboradores (2004) detectou uma diminuição na expressão de HHIP em amostras de câncer de fígado, estômago, cólon, reto e pulmão, quando comparado à contraparte normal, sugerindo um papel de supressor tumoral para HHIP.

Um estudo realizado por Song et al. (2013) comparou a expressão de HHIP em carcinoma de estômago e em mucosa normal, e foi observada uma diminuição na expressão de HHIP nos casos de carcinoma. Esses autores pesquisaram a causa potencial da perda de expressão do HHIP em tecidos de câncer gástrico, e observaram uma metilação aberrante do gene HHIP. Portanto, a metilação da região promotora do gene proporcionou o silenciamento da expressão de HHIP. Outro estudo realizado por esse grupo, concluiu que a metilação da região promotora do gene HHIP pode ser associada com a carcinogênese do câncer gástrico, de modo que a detecção do nível de metilação do gene HHIP pode ser um novo marcador clínico para o diagnóstico precoce (SONG; ZUO, 2014).

Por outro lado, a proteína HHIP é regulada positivamente em resposta à ativação da via Hh, uma vez que o HHIP é um gene alvo da via (CHUANG; MCMAHON, 1999; BOSANAC et al., 2009). Nesse trabalho, a maioria dos casos de CAC e CME apresentou alta expressão de HHIP, enquanto que os casos de AP apresentou baixa expressão de HHIP, apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa, é possível sugerir que a alta expressão nuclear de GLI1, presente no CAC e no CME, tenha desencadeado a superexpressão de HHIP nos casos de CAC e CME.

SUFU é um regulador negativo da via Hh, que se associa às proteínas GLI, antagonizando sua atividade por dois mecanismos: sequestro de GLI no citoplasma ou inibição da atividade transcricional de GLI (MERCHANT et al., 2004; JIA et al., 2009; MIN et al., 2011). Dessa forma, alguns estudos têm demonstrado o papel de SUFU na supressão tumoral (WANG et al., 2013; YAN et al., 2013).

Contudo, outro estudo detectou uma superexpressão da proteína supressora SUFU em câncer de próstata (KIM et al., 2011). No presente trabalho, também foi observada uma alta expressão de SUFU na maioria dos casos de CME, de AP e em alguns casos de CAC. Tal fato pode ser justificado através do estudo realizado por Liu e colaboradores (2012), que propõe um papel positivo para o SUFU na via Hh. Esses autores acreditam que na presença do SUFU, o GLI inativo está protegido da degradação, uma vez que está associado ao SUFU, podendo ser subsequentemente ativado. Dessa forma, o SUFU permite que a ativação da via Hh seja máxima e contínua. Em contraste, as proteínas GLI são degradadas rapidamente na ausência do SUFU, impedindo a ativação máxima da via.

No presente estudo, observamos uma elevada marcação parenquimal de componentes da via Hh nos casos de CAC e CME quando comparado à marcação estromal, sendo essa diferença estatisticamente significativa, no entanto, em alguns casos de AP e CME, notou-se a marcação de fibroblastos e vasos sanguíneos. Um estudo realizado por Leovic et al. (2012) em

carcinoma escamocelular de boca e de orofaringe, observou marcação parenquimal para SHH, PTCH1 e GLI1, e também detectou marcação estromal dessas proteínas. Estudos afirmam que o ligante SHH produzido pelas células epiteliais tumorais podem ativar a via Hh nas células mesenquimais, tornando o estroma favorável para o desenvolvimento tumoral (INGHAM; MCMAHON, 2001; YAUCH et al., 2008; DAMHOFER et al., 2013). Nossos achados sugerem que, além da ativação autócrina nas células parenquimais, também pode ocorrer a ativação parácrina dessas células.

A transição epitélio-mesênquima (TEM), originalmente descrita durante o desenvolvimento embrionário, é um processo no qual as células epiteliais perdem o fenótipo epitelial e passam a expressar características mesenquimais (DE CRAENE; BERX, 2013; HAO et al., 2013). A base molecular da TEM envolve mudanças na expressão, distribuição e/ou função de proteínas, por exemplo, uma diminuição de marcadores epiteliais, como a e-caderina, e o aumento na expressão de marcadores mesenquimais, como a vimentina (SETHI et al., 2011). Evidências sugerem que a TEM desempenha um papel importante durante a progressão e metástase de tumores malignos (WANG et al., 2014). Atualmente, estudos tem demonstrado uma associação entre a via Hh e a TEM, observando-se uma alta expressão de GLI1 e uma baixa expressão de e-caderina (YOO et al., 2011; BEHNSAWY et al., 2013; FAN et al., 2014; WANG et al., 2014; YUE et al., 2014). Portanto, sugerimos a realização de novos estudos para avaliar a associação da via Hh com a TEM em tumores de glândula salivar.

Alguns trabalhos têm mostrado o papel da via Hh na morfogênese das glândulas salivares (JASKOLL et al., 2004; HASHIZUME; HIEDA, 2006; FIASCHI et al., 2011) e, como demonstrado neste estudo, os componentes da via Hh também parecem exercer uma participação importante na morfogênese do AP, CAC e CME, tendo em vista a sua presença nos diferentes padrões morfológicos dessas neoplasias, incluindo células luminais de AP e CAC. Apesar desse aspecto, Jaskoll et al., (2004) concluíram, através de estudos *in vivo* e

em cultura de células glândulas submandibulares de camundongo, que a via de sinalização Hh desempenha funções importantes durante o desenvolvimento embrionário, participando da proliferação epitelial e da morfogênese da glândula submandibular. Outro estudo realizado por Hashizume e Hieda (2006) em glândulas salivares de camundongos, sugere que a via de sinalização Hh promove a formação de lúmen e a polarização celular do epitélio durante o desenvolvimento glandular.

Fiaschi et al. (2011), visando analisar as consequências da ativação aberrante da via de sinalização Hh em glândula salivar normal, realizaram um estudo expressando transgenicamente a proteína efetora GLI1 em glândulas salivares de camundongo, e observaram uma alteração na estrutura de todas as glândulas salivares maiores, exibindo lesões hiperplásicas e metaplásicas. Além disso, observaram uma expansão das estruturas ductais, e uma diminuição dos ácinos, sugerindo que a ativação da via Hh pode promover a proliferação das células ductais e o bloqueio da diferenciação dos ácinos. No presente estudo, observou-se marcação de SHH, HHIP, SUFU e GLI1 em áreas de glândula salivar morfologicamente normal adjacentes aos casos de CAC e CME, principalmente nas células ductais. Sabendo-se que o CAC e o CME tem origem a partir das células do ducto intercalar e excretor, respectivamente (ADAMS; WARNER; NÖR, 2013), e que as células ductais, apesar de baixa, apresentam capacidade de proliferação (IHLER et al., 2002), sugerimos que os componentes da via Hh podem participar da tumorigênese de neoplasias de glândula salivar.

O fator de transcrição STAT3 foi inicialmente descrito no contexto da sinalização de citocinas, durante a inflamação. Em seguida, verificou-se que a via do STAT3 pode ser ativada por fatores de crescimento presentes no microambiente tumoral (SIVEEN et al., 2014). Após ligação com o receptor, os ligantes induzem a dimerização do receptor, e subsequente dimerização da JAK associada ao receptor. As JAKs autofosforilam-se e, em seguida, ocorre a fosforilação das proteínas STATs. As STATs fosforiladas são translocadas para o núcleo, onde

induzem a transcrição de genes alvos. Posteriormente, as STATs são inativadas por desfosforilação e retornam para o citoplasma (DARNELL; KERR; STARK, 1994; ZHONG; WEN; DARNELL, 1994; LEONARD; SHEA, 1998; YANG et al., 2012b; PANDURANGAN; ESA, 2014).

Estudos têm demonstrado o potencial oncogênico do STAT3, uma vez que essa proteína encontra-se constitutivamente ativada em diversos tumores, como câncer de pulmão (SONG et al., 2003; LI et al., 2007; XU, LU, 2014), de mama (CHEN et al., 2013; CHUNG et al., 2014), de ovário (HAN et al., 2013), colorretal (LASSMANN et al., 2007; DOBI et al., 2013) e de glândula salivar (ARAÚJO et al., 2008; NIKITAKIS et al., 2009a, 2009b; ETTL et al., 2012). A ativação persistente do STAT3 em células tumorais promove a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular, na sobrevivência celular, na angiogênese e na regulação imune (SONG et al., 2003; LI et al., 2007; SIVEEN et al., 2014).

No presente estudo, observou-se marcação citoplasmática de STAT3 em células ductais de glândula salivar morfológicamente normal, e alta expressão nuclear no CAC, enquanto que o AP e o CME também apresentaram marcação citoplasmática, sendo essas diferenças estatisticamente significantes. Um estudo realizado por Araújo et al., (2007) analisou a imunexpressão de STAT3 e pSTAT3 em tumores de glândula salivar, os resultados obtidos para o STAT3 em glândula normal, AP, CAC e CME foram semelhantes aos do presente estudo. Sugerimos que o STAT3 desempenha um papel importante na regulação de processos associados à proliferação e sobrevivência celular no CAC, mas não no AP e CME.

Nikitakis e colaboradores (2009a) realizaram um estudo com linhagem de células de adenocarcinoma de glândula salivar, e observaram que o STAT3 e a survivina, uma proteína responsável pela inibição da apoptose e gene alvo do STAT3, contribuem para o crescimento e sobrevivência das células do adenocarcinoma de glândula salivar, reafirmando a hipótese de que o STAT3 participa do desenvolvimento tumoral em glândula salivar. Outro estudo

realizado por esse grupo, com amostras de tumores de glândula salivar, demonstrou a expressão das proteínas survivina e pSTAT3 tanto nos tumores benignos como nos malignos (NIKITAKIS et al., 2009b). Por outro lado, um estudo realizado por Ettl et al., (2012), detectou uma perda de expressão de pSTAT em carcinomas de glândula salivar, a razão para esta observação contraditória ainda não está clara.

Tendo em vista que a ativação aberrante da via Hh tem sido identificada em diversas neoplasias (YANG et al., 2012a; HAO et al., 2013; IM et al., 2013; WAN et al., 2014; HINTERSEHER et al., 2014; GURGEL et al., 2014) e que o STAT3 possui funções importantes no desenvolvimento tumoral (BROMBERG et al., 1999; BOURNAZOU, BROMBERG 2013), estudos foram realizados buscando associar a expressão de componentes da via Hh com o STAT3 (SENGUPTA et al., 2007; LI et al., 2007; YANG et al., 2012b; DONG et al., 2014).

Em nosso trabalho, observou-se uma alta expressão de GLI1 e de STAT3 no CAC, entretanto, não foi observada correlação estatisticamente significativa entre as duas proteínas. Sugerimos que as duas proteínas exercem papel importante no desenvolvimento do CAC, mas de maneira independente. Por outro lado, estudos têm demonstrado uma correlação entre o STAT3 e a via Hh. Sengupta et al. (2007) observaram em leucemia mielóide crônica, que a via de sinalização Hh induz a fosforilação e ativação do STAT3, uma vez ativo, o STAT3 induz a expressão de proteínas que auxiliam no desenvolvimento tumoral, como: Wnt3a, Lef1, ciclina D1, p21 e GLI1. Recentemente, um estudo realizado em carcinoma papilífero de tireóide observou uma associação positiva e significativa entre pSTAT e componentes da via Hh (SHH, PTCH, SMO e GLI1), entretanto, o mecanismo pelo qual a via Hh induz a fosforilação do STAT3 permanece incerto (DONG et al., 2014).

Um estudo realizado por Li e colaboradores (2007) mostrou que a ativação persistente do STAT3 desencadeia a inflamação e a tumorigênese espontânea em pulmão de camundongo. Além disso, observou-se que alguns genes de desenvolvimento, como SHH e o fator de

transcrição TTF-1, estão aumentados em pulmão de camundongos transgênicos que superexpressam STAT3. Com base nesses achados, outro estudo foi realizado por esse grupo. Na análise imunoistoquímica, observou-se uma associação entre o nível de expressão de pSTAT3 e componentes da via Hh em adenocarcinomas de pulmão e em hiperplasia adenomatosa atípica, sugerindo uma relação entre essas duas vias. Novos ensaios de cotransfecção demonstraram que o fator de transcrição TTF-1 atuou como um mediador entre STAT3 e a ativação dos genes da via Hh, sugerindo um mecanismo de regulação indireto (YANG et al., 2012b).

O MCM3 é uma proteína de ligação ao DNA, que desempenha um papel importante na iniciação e na progressão do ciclo celular em células eucarióticas (FORSBURG, 2004; LEE et al., 2010; ASHKAVANDI et al., 2013). Está expresso em células que estão em divisão, enquanto que em células quiescentes ocorre a perda de expressão. Portanto, o MCM3 é uma nova classe de marcador de proliferação celular (MADINE et al., 2000; FORSBURG, 2004; LAMEIRA et al., 2014).

Um estudo realizado por Endl et al. (2001) demonstrou que o anticorpo anti-MCM3 detecta células em proliferação, bem como as células que já cessaram a proliferação, mas que não estão totalmente diferenciadas. Outro estudo, realizado em displasias orais e carcinoma escamocelular oral, sugeriu que o MCM3 pode ser um marcador de proliferação e diferenciação celular (LAMEIRA et al., 2014).

No presente trabalho, o AP e o CME apresentaram baixa expressão de MCM3, enquanto que o CAC apresentou alta expressão em apenas metade dos casos, sendo essa diferença estatisticamente significativa. De acordo com os nossos resultados, o MCM3 parece não ser um bom marcador de proliferação para tumores de glândula salivar. Entretanto, um estudo realizado em tumores benignos e malignos de glândula salivar, detectou índices elevados de MCM3 no CAC e no CME quando comparado ao AP, e concluiu que o MCM3 pode ser um novo marcador

de proliferação em tumores de glândulas salivares e ser utilizado para o diagnóstico diferencial entre esses tumores (ASHKAVANDI et al., 2013). Portanto, novos estudos devem ser realizados para avaliar a efetividade do MCM3 como marcador de proliferação em tumores de glândula salivar.

No presente estudo, foi realizada a análise da expressão das proteínas aqui estudadas nos diferentes tipos histológicos do CAC (cribriforme e sólido), mas não foi observada diferença estatística. Nos graus histológicos de CME, apesar de não estatisticamente significante, observou-se que os tumores de baixo grau apresentaram menores índices de marcação para o SHH, GLI1 e MCM3, enquanto que para SUFU e HHIP os índices foram maiores. Nos tumores de alto grau, foram observados índices de marcação maiores para SHH, GLI1, HHIP e MCM3. Sugerimos que a via Hh parece apresentar maior participação no desenvolvimento de CME de alto grau quando comparado com os demais graus, uma vez que esse tipo histológico apresenta pior prognóstico. Nossos achados corroboram o estudo de Li et al. (2011), no qual foi detectada uma maior expressão de SHH, PTCH e GLI1 em gliomas de alto grau de malignidade, quando comparados aos gliomas de baixo grau.

Ao comparar os dados clínicos, como: sexo, idade, localização, tamanho e invasão perineural com os componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 não foram observadas diferenças significantes. Estudos realizados em carcinoma escamocelular de boca, concluíram que a ativação da via Hh está associada com a recorrência e a metástase em linfonodos (WANG et al., 2012; FAN et al., 2014). Para o STAT3, um estudo realizado em carcinoma escamocelular de esôfago, demonstrou que a alta expressão de STAT3 está associada com tumores em estágios avançados, por outro lado, não foi observada associação com idade, gênero, invasão e grau histológico (LI et al., 2014). Portanto, sugerimos que novos estudos sejam realizados em tumores de glândula salivar, para associar a via Hh, STAT3 e o MCM3 com outras características clínicas associadas com a sobrevida dos pacientes.

Nesse estudo, não foi observada a associação entre os componentes da via Hh, STAT3 e MCM3 com a inflamação. A relação entre a inflamação e a via Hh ainda é controversa, estudos afirmam que a inflamação não interfere na ativação da via Hh (STEWART et al., 2003), ou que a inflamação ativa a via Hh (AMANKULOR et al., 2009) ou ainda que a via Hh atenua a inflamação (ZHOU et al., 2012), portanto, é necessário que estudos sejam realizados para esclarecer o papel da inflamação na via Hh. Por outro lado, a relação entre o STAT3 e a inflamação é bem estabelecida, uma vez que o STAT3 pode ser ativado por diversos fatores pró-inflamatórios, como citocinas e interleucinas (AGGARWAL et al., 2009).

Tendo em vista a importância da via Hh e do STAT3 no desenvolvimento tumoral (TOFTGARD, 2000; LI et al., 2007; AMAKYE, JAGANI, DORSCH, 2013; ASHKAVANDI et al., 2013), estudos têm sido realizados buscando inibidores dessas vias (JALILI et al., 2013; XIAO et al., 2014). Os inibidores da via Hh são uma classe nova e promissora de drogas com potencial terapêutico para o tratamento do câncer. Algumas moléculas inibidoras, direcionadas para alvos distintos da via Hh (SHH, SMO e GLI), já foram descritas, como: ciclopamina, IPI926, LDE 225, GANT61, GANT58 e robotnikinin (PEUKERT; MILLER-MOSLIN, 2010). Muitos inibidores da via STAT3 também já foram descritos (Piceatannol, Sanguarine, ISS-610, STA-21, LLL12, entre outros) atuando, principalmente, na inibição da fosforilação e/ou dimerização do STAT3 (MIKLOSSY; HILLIARD; TURKSON, 2013).

Por fim, os resultados desse trabalho apontam para uma possível participação da via Hh na morfogênese e no desenvolvimento do AP, CAC e CME, assim como a participação do STAT3 no desenvolvimento do CAC. Em adição, o MCM3 não parece ser um bom marcador de proliferação para tumores de glândula salivar. Sugerimos que novos estudos sejam realizados visando compreender o mecanismo pelo qual a via Hh e o STAT3 promovem o crescimento e progressão desses tumores e identificar inibidores dessas vias, para que, no futuro, seja possível a aplicação de novas terapias no tratamento de tumores de glândula salivar.

7 CONCLUSÕES

Os casos de AP apresentaram marcação nuclear de GLI1 nas células mioepiteliais e nas células luminais, enquanto a maioria dos casos de CME apresentou marcação nuclear de GLI1 nas células intermediárias e epidemóides. Já os casos de CAC apresentaram marcação nuclear de GLI1 em áreas sólidas e cribriformes. Portanto, esses resultados apontam para a ativação da via Hh nos tumores aqui estudados, e possível contribuição para o desenvolvimento desses tumores.

A marcação predominantemente nuclear do STAT3 em áreas sólidas e de células mais internas do padrão cribriforme do CAC, indica que o STAT3 pode ser importante no desenvolvimento do CAC. Por outro lado, o CME apresentou marcação citoplasmática de células intermediárias e epidermóides, e no AP foi observada marcação citoplasmática de células mioepiteliais, indicando que o STAT3 não está ativo no CME e no AP.

O MCM3 parece não ser um bom marcador de proliferação e diferenciação celular para tumores de glândula salivar, uma vez que os casos de CME apresentaram baixa expressão desse marcador.

E por fim, não foi possível estabelecer correlação entre a via Hh e o STAT3 nos tumores aqui estudados (AP, CAC e CME).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, A.; WARNER, K.; NÖR, J. E. Salivary gland cancer stem cells. **Oral Oncology**, v. 49, n. 9, p. 845–53, set. 2013.
- AGGARWAL, B. B. et al. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1171, p. 59–76, ago. 2009.
- AIGNER, T. et al. Epithelial-mesenchymal transdifferentiation and extracellular matrix gene expression in pleomorphic adenomas of the parotid salivary gland. **The Journal of Pathology**, v. 186, n. 2, p. 178–85, out. 1998.
- AKRISH, S. et al. Malignant salivary gland tumors and cyclo-oxygenase-2: a histopathological and immunohistochemical analysis with implications on histogenesis. **Oral Oncology**, v. 45, n. 12, p. 1044–50, dez. 2009.
- AL-KHATEEB, T. H.; ABABNEH, K. T. Salivary tumors in north Jordanians: a descriptive study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, And Endodontics**, v. 103, n. 5, p. e53–9, maio 2007.
- ALVES, F. A. et al. Pleomorphic adenoma of the submandibular gland: clinicopathological and immunohistochemical features of 60 cases in Brazil. **Archives of Otolaryngology--head & neck surgery**, v. 128, n. 12, p. 1400–3, dez. 2002.
- AMAKYE, D.; JAGANI, Z.; DORSCH, M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1410–22, nov. 2013.
- AMANKULOR, N. M. et al. Sonic hedgehog pathway activation is induced by acute brain injury and regulated by injury-related inflammation. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 33, p. 10299–308, 19 ago. 2009.
- AMIT, M. et al. International collaborative validation of intraneural invasion as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **Head & Neck** p. 1–8, 2014.
- ANSARI, M. H. Salivary gland tumors in an Iranian population: a retrospective study of 130 cases. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n. 11, p. 2187–94, nov. 2007.
- ARAÚJO, V. DE et al. STAT3 expression in salivary gland tumours. **Oral Oncology**, v. 44, n. 5, p. 439–445, 2008.
- ASHKAVANDI, Z. J. et al. MCM3 as a Novel Diagnostic Marker in Benign and Malignant Salivary Gland Tumors. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 6, p. 3479–3482, 30 jun. 2013.
- ATANDA, A. et al. A histopathologic study of salivary gland tumors in Kano, northern Nigeria. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 473-476, 13 jan. 2009.

- AUCLAIR, P. L.; GOODE, R. K.; ELLIS, G. L. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. **Cancer**, v. 69, n. 8, p. 2021–30, 15 abr. 1992.
- BAI, S. et al. Salivary mucoepidermoid carcinoma: a multi-institutional review of 76 patients. **Head and Neck Pathology**, v. 7, n. 2, p. 105–12, jun. 2013.
- BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY D. (Eds): **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. IARC Press: Lyon 2005.
- BARROS, A. et al. Minor salivary gland tumors in a south American population. **Archive of Oncology**, v. 18, n. 3, p. 56–59, 2010.
- BEHNSAWY, H. M. et al. Possible role of sonic hedgehog and epithelial-mesenchymal transition in renal cell cancer progression. **Korean Journal of Urology**, v. 54, n. 8, p. 547–54, ago. 2013.
- BLOTTA, S. et al. Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. **Blood**, v. 120, n. 25, p. 5002–13, 13 dez. 2012.
- BOAHENE, D. K. O. et al. Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland: the Mayo clinic experience. **Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery**, v. 130, n. 7, p. 849–56, jul. 2004.
- BOSANAC, I. et al. The structure of SHH in complex with HHIP reveals a recognition role for the Shh pseudo active site in signaling. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 7, p. 691–7, jul. 2009.
- BOURNAZOU, E.; BROMBERG, J. Targeting the tumor microenvironment JAK-STAT3 signaling. **Jak-Stat**, v. 2, n. 2, p. 1–8, jun. 2013.
- BRADLEY, P. J. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, v. 12, n. 2, p. 127–32, abr. 2004.
- BRAZÃO-SILVA, M. T. et al. Adenoid cystic carcinoma of the salivary gland: a clinicopathological study of 49 cases and of metallothionein expression with regard to tumour behaviour. **Histopathology**, v. 63, n. 6, p. 802–9, dez. 2013.
- BROMBERG, J. F. et al. Stat3 as an Oncogene. **Cell**, v. 98, n. 3, p. 295–303, 1999.
- CHE, L. et al. Activation of sonic hedgehog signaling pathway is an independent potential prognosis predictor in human hepatocellular carcinoma patients. **Chinese Journal of Cancer Research = Chung-kuo yen cheng yen chiu**, v. 24, n. 4, p. 323–31, dez. 2012.
- CHEN, Y. et al. Breast Cancer STAT3, a poor survival predictor, is associated with lymph node metastasis from breast cancer. **Journal of Breast Cancer**, v. 16, n. 1, p. 40–49, mar. 2013.

- CHENG, W. et al. Role of Hedgehog signaling pathway in proliferation and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 34, n. 3, p. 829–836, mar. 2009.
- CHIDZONGA, M. M.; LOPEZ PEREZ, V. M.; PORTILLA-ALVAREZ, A. L. Salivary gland tumours in Zimbabwe: report of 282 cases. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 24, n. 4, p. 293–7, ago. 1995.
- CHUANG, P.; MCMAHON, A. P. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. **Nature**, v. 397, n. 6720, p. 617–621, 1999.
- CHUNG, S. S. et al. STAT3 activation in HER2-overexpressing breast cancer promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell traits. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 2, p. 403–11, fev. 2014.
- COHEN, M. M. The hedgehog signaling network. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 123A, n. 1, p. 5–28, nov. 2003.
- DAI, J. et al. Sonic hedgehog expression correlates with distant metastasis in pancreatic adenocarcinoma. **Pancreas**, v. 40, n. 2, p. 233–236, 2011.
- DAMHOFER, H. et al. Assessment of the stromal contribution to Sonic Hedgehog-dependent pancreatic adenocarcinoma. **Molecular Oncology**, v. 7, n. 6, p. 1031–42, dez. 2013.
- DANIELS, J. S. M. et al. Pleomorphic adenoma of the palate in children and adolescents: a report of 2 cases and review of the literature. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n. 3, p. 541–9, mar. 2007.
- DARNELL, J. E. STATs and gene regulation. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1630–5, set. 1997.
- DARNELL, J. E.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, v. 264, n. 5164, p. 1415–21, jun. 1994.
- DE ANDRADE, B. A. B. et al. Expression of minichromosome maintenance 2, Ki-67, and geminin in oral nevi and melanoma. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 17, n. 1, p. 32–6, fev. 2013.
- DE CRAENE, B.; BERX, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. **Nature Reviews. Cancer**, v. 13, n. 2, p. 97–110, fev. 2013.
- DE OLIVEIRA, F. A. et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian population. **Head and Neck Pathology**, v. 3, n. 4, p. 271–5, dez. 2009.
- DEMARIA, M.; CAMPOREALE, A.; POLI, V. STAT3 and metabolism: how many ways to use a single molecule? **International Journal of Cancer. Journal International du Cancer**, v. 135, n. 9, p. 1997–2003, 1 nov. 2014.

- DOBI, E. et al. Impact of STAT3 phosphorylation on the clinical effectiveness of anti-EGFR-based therapy in patients with metastatic colorectal cancer. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 12, n. 1, p. 28–36, mar. 2013.
- DONG, W. et al. Aberrant sonic hedgehog signaling pathway and STAT3 activation in papillary thyroid cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 7, p. 1786–1793, 2014.
- DULTRA, F. K. A. A. et al. Immunohistochemical assessment of CD1a-positive Langerhans cells and their relationship with E-cadherin in minor salivary gland tumors. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 1, p. 47–53, jan. 2012.
- ENDL, E. et al. The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells. **The Journal of Pathology**, v. 195, n. 4, p. 457–62, nov. 2001.
- ENESCU, A. S. et al. The involvement of growth differentiation factor 5 (GDF5) and aggrecan in the epithelial-mesenchymal transition of salivary gland pleomorphic adenoma. **Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie**, v. 54, n. 4, p. 969–76, jan. 2013.
- ERDEM, M. A. et al. Pleomorphic adenoma of the palate. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 22, n. 3, p. 1131–4, maio 2011.
- ETTL, T. et al. EGFR, HER2, survivin, and loss of pSTAT3 characterize high-grade malignancy in salivary gland cancer with impact on prognosis. **Human Pathology**, v. 43, n. 6, p. 921–31, jun. 2012.
- FAN, H.-X. et al. Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by activating MMP-9 and E-cadherin expression. **Medical Oncology**, v. 31, n. 7, p. 41, jul. 2014.
- FIASCHI, M. et al. Targeted expression of GLI1 in the salivary glands results in an altered differentiation program and hyperplasia. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 5, p. 2569–79, nov. 2011.
- FORSBURG, S. L. Eukaryotic MCM Proteins : Beyond Replication Initiation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 68, n. 1, p. 109-31, mar. 2004.
- GAO, B. et al. Review STAT proteins – Key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 2, p. 430–441, 2012.
- GARCÍA DE MARCOS, J. A. et al. Primary adenoid cystic carcinoma of the mandible: case report and review of the literature. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 66, n. 12, p. 2609–15, dez. 2008.
- GARCIA, R. et al. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. **Cell Growth & Differentiation**, v. 8, n. 12, p. 1267–76, dez. 1997.

GIANNINI, P. J. et al. Adenoid cystic carcinoma of the buccal vestibule: A case report and review of the literature. **Oral Oncology**, v. 42, n. 10, p. 1029–32, nov. 2006.

GOODE, R. K.; AUCLAIR, P. L.; ELLIS, G. L. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. **Cancer**, v. 82, n. 7, p. 1217–24, 1 abr. 1998.

GURGEL, C. A. S. et al. Transcriptional profiles of SHH pathway genes in keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 43, n. 8, p. 619–26, set. 2014.

HAN, Z. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Silencing of the STAT3 signaling pathway reverses the inherent and induced chemoresistance of human ovarian cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 435, n. 2, p. 188–194, 2013.

HAO, K. et al. Hedgehog signaling pathway regulates human pancreatic cancer cell proliferation and metastasis. **Oncology Reports**, v. 29, n. 3, p. 1124–32, mar. 2013.

HASHIZUME, A.; HIEDA, Y. Hedgehog peptide promotes cell polarization and lumen formation in developing mouse submandibular gland. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 3, p. 996–1000, jan. 2006.

HINTERSEHER, U. et al. Expression of hedgehog signalling pathway in anaplastic thyroid cancer. **Endocrine**, v. 45, n. 3, p. 439–47, abr. 2014.

IHRLER, S. et al. A morphogenetic concept of salivary duct regeneration and metaplasia. **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, v. 440, n. 5, p. 519–26, maio 2002.

IM, S. et al. Hedgehog related protein expression in breast cancer: gli-2 is associated with poor overall survival. **Korean Journal of Pathology**, v. 47, n. 2, p. 116–23, abr. 2013.

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

JAAFARI-ASHKAVANDI, Z.; ASHRAF, M.-J.; MOSHAVERINIA, M. Salivary Gland Tumors: A Clinicopathologic Study of 366 Cases in Southern Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 1, p. 27–30, 31 jan. 2013.

JABER, M. A. Intraoral minor salivary gland tumors: a review of 75 cases in a Libyan population. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35, n. 2, p. 150–4, fev. 2006.

JALILI, A. et al. NVP-LDE225, a potent and selective SMOOTHENED antagonist reduces melanoma growth in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69064, jan. 2013.

JASKOLL, T. et al. Sonic hedgehog signaling plays an essential role during embryonic salivary gland epithelial branching morphogenesis. **Developmental Dynamics**, v. 229, n. 4, p. 722–32, abr. 2004.

JIA, J. et al. Suppressor of Fused inhibits mammalian Hedgehog signaling in the absence of cilia. **Developmental Biology**, v. 330, n. 2, p. 452–60, jun. 2009.

KANDA, S. et al. Anti-apoptotic role of the sonic hedgehog signaling pathway in the proliferation of ameloblastoma. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 3, p. 695–702, set. 2013.

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, set. 2009.

KHAN, A. J. et al. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. **International Journal of Cancer**, v. 96, n. 3, p. 149–58, jun. 2001.

KIM, T. J. et al. Hedgehog signaling protein expression and its association with prognostic parameters in prostate cancer: a retrospective study from the view point of new 2010 anatomic stage/prognostic groups. **Journal of Surgical Oncology**, v. 104, n. 5, p. 472–9, out. 2011.

LAMEIRA, A. G. et al. MCM3 could be a better marker than Ki-67 for evaluation of dysplastic oral lesions: an immunohistochemical study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 43, n. 6, p. 427–34, jul. 2014.

LASSMANN, S. et al. STAT3 mRNA and protein expression in colorectal cancer: effects on STAT3-inducible targets linked to cell survival and proliferation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 60, n. 2, p. 173–9, fev. 2007.

LEE, S. et al. Sonic hedgehog expression in gastric cancer and gastric adenoma. **Oncology Reports**, v. 17, n. 5, p. 1051–1055, 2007.

LEE, Y. S. et al. Minichromosome maintenance protein 3 is a candidate proliferation marker in papillary thyroid carcinoma. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 88, n. 1, p. 138–42, fev. 2010.

LEONARD, W. J.; SHEA, J. J. O. Jaks and STATs: biological implications. **Annual Review of Immunology**, v. 16, p. 293–322, 1998.

LEOVIC, D. et al. Hh-Gli signaling pathway activity in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head & Neck**, v. 34, n. 1, p. 104–12, jan. 2012.

LI, H. et al. Dual high expression of STAT3 and cyclinD1 is associated with poor prognosis after curative resection of esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 11, p. 7989–7998, 2014.

LI, L.J. et al. Clinical analysis of salivary gland tumor cases in West China in past 50 years. **Oral Oncology**, v. 44, n. 2, p. 187–92, fev. 2008.

LI, Q. et al. The Hedgehog signalling pathway and its prognostic impact in human gliomas. **ANZ Journal of Surgery**, v. 81, n. 6, p. 440–5, jun. 2011.

LI, Y. et al. Activation of the signal transducers and activators of the transcription 3 pathway in alveolar epithelial cells induces inflammation and adenocarcinomas in mouse lung. **Cancer Research**, v. 67, n. 18, p. 8494–503, set. 2007.

LINGAM, R. K. et al. Pleomorphic adenoma (benign mixed tumour) of the salivary glands: its diverse clinical, radiological, and histopathological presentation. **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 49, n. 1, p. 14–20, jan. 2011.

LIU, J. et al. Dual function of suppressor of fused in Hh pathway activation and mouse spinal cord patterning. **Developmental Biology**, v. 362, n. 2, p. 141–53, fev. 2012.

LOYOLA, A. M. et al. Minor salivary gland tumours. A retrospective study of 164 cases in a Brazilian population. **European Journal of Cancer. Part B, Oral Oncology**, v. 31B, n. 3, p. 197–201, maio 1995.

LUKŠIĆ, I. et al. Intraoral adenoid cystic carcinoma: is the presence of perineural invasion associated with the size of the primary tumour, local extension, surgical margins, distant metastases, and outcome? **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 52, n. 3, p. 214–8, mar. 2014.

LUNA, M. A. Salivary mucoepidermoid carcinoma: revisited. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 13, n. 6, p. 293–307, nov. 2006.

MA, G.; XIAO, Y.; HE, L. Recent progress in the study of Hedgehog signaling. **Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao**, v. 35, n. 3, p. 129–37, mar. 2008.

MADINE, M. A et al. The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. **Journal of Structural Biology**, v. 129, n. 2-3, p. 198–210, abr. 2000.

MAS, C.; RUIZ I ALTABA, A. Small molecule modulation of HH-GLI signaling: current leads, trials and tribulations. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 5, p. 712–23, set. 2010.

MCHUGH, C. H. et al. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. **Cancer**, v. 118, n. 16, p. 3928–36, ago. 2012.

MCHUGH, J. B.; VISSCHER, D. W.; BARNES, E. L. Update on Selected Salivary Gland Neoplasms. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 133, n. 11, p. 1764-74, nov. 2009.

MENDENHALL, W. M. et al. Salivary gland pleomorphic adenoma. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 1, p. 95–9, fev. 2008.

MERCHANT, J. L. Hedgehog signalling in gut development, physiology and cancer. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. Pt 3, p. 421–32, fev. 2012.

MERCHANT, M. et al. Suppressor of Fused Regulates Gli Activity through a Dual Binding Mechanism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 19, p. 8627–8641, 2004.

MICHAUD, E. J.; YODER, B. K. The primary cilium in cell signaling and cancer. **Cancer Research**, v. 66, n. 13, p. 6463–7, jul. 2006.

MIKLOSSY, G.; HILLIARD, T. S.; TURKSON, J. Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 12, n. 8, p. 611–29, ago. 2013.

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Frequent Deregulations in the Hedgehog Signaling Network and Cross-Talks with the Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Involved in Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 497–524, 2010.

MIN, T. H. et al. The dual regulator Sufu integrates Hedgehog and Wnt signals in the early *Xenopus* embryo. **Developmental Biology**, v. 358, n. 1, p. 262–76, 1 out. 2011.

MOSKALUK, C. A. Adenoid cystic carcinoma: clinical and molecular features. **Head and Neck Pathology**, v. 7, n. 1, p. 17–22, mar. 2013.

NAGAO, T. et al. Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors: application for surgical pathology practice. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 45, n. 5, p. 269–82, out. 2012.

NIKITAKIS, N. G. et al. The oncogenic effects of constitutive Stat3 signaling in salivary gland cancer cells are mediated by survivin and modulated by the NSAID sulindac. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 107, n. 6, p. 826–36, jun. 2009a.

NIKITAKIS, N. G. et al. Immunohistochemical expression of the oncogenic molecules active Stat3 and survivin in benign and malignant salivary gland tumors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 107, n. 6, p. 837–43, jun. 2009b.

NÜSSLEIN-VOLHARD, C.; WIESCHAUS, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. **Nature**, v. 287, n. 5785, p. 795–801, out. 1980.

O'NEILL, I. D. t(11;19) translocation and CRTCl-MAML2 fusion oncogene in mucoepidermoid carcinoma. **Oral Oncology**, v. 45, n. 1, p. 2–9, jan. 2009.

OKOLOWSKY, N.; FURTH, P. A.; HAMEL, P. A. Oestrogen receptor-alpha regulates non-canonical Hedgehog-signalling in the mammary gland. **Developmental Biology**, v. 391, n. 2, p. 219–29, jul. 2014.

OLSEN, C. L. et al. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. **BMC Cancer**, v. 4, p. 43, ago. 2004.

ONISCU, A. et al. Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia. **The Journal of Pathology**, v. 203, n. 4, p. 909–17, ago. 2004.

- PANDURANGAN, A. K.; ESA, N. M. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 - A Promising Target in Colitis-Associated Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 2, p. 551–560, jan. 2014.
- PEPINSKY, R. B. et al. Mapping sonic hedgehog-receptor interactions by steric interference. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 15, p. 10995–1001, 14 abr. 2000.
- PERSSON, M. et al. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 44, p. 18740–4, 3 nov. 2009.
- PEUKERT, S.; MILLER-MOSLIN, K. Small-molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway as cancer therapeutics. **Chemistry Medical Chemical**, v. 5, n. 4, p. 500–12, 6 abr. 2010.
- POLIZIO, A. H. et al. Sonic Hedgehog activates the GTPases Rac1 and RhoA in a Gli-independent manner through coupling of smoothed to Gi proteins. **Science Signaling**, v. 4, n. 200, p. pt7, jan. 2011.
- RAHNAMA, M. et al. Pleomorphic adenoma of the palate: a case report and review of the literature. **Contemporary Oncology**, v. 17, n. 1, p. 103–6, jan. 2013.
- RAPIDIS, A. D. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Clinicopathological analysis of 23 patients and review of the literature. **Oral Oncology**, v. 41, n. 3, p. 328–35, mar. 2005.
- RAPIDIS, A. D. et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. **Oral Oncology**, v. 43, n. 2, p. 130–6, fev. 2007.
- RUIZ I ALTABA, A.; SÁNCHEZ, P.; DAHMANE, N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 361–72, maio 2002.
- SENGUPTA, A et al. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. **Leukemia**, v. 21, n. 5, p. 949–55, maio 2007.
- SETHI, S. et al. Molecular signature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer bone metastasis. **American Journal of Translational Research**, v. 3, n. 1, p. 90–99, 2011.
- SHEN, C. et al. Treatment outcomes and prognostic features in adenoid cystic carcinoma originated from the head and neck. **Oral Oncology**, v. 48, n. 5, p. 445–9, maio 2012.
- SIMPSON, R. H. W. et al. Recent advances in the diagnostic pathology of salivary carcinomas. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 4, p. 371–84, out. 2014.
- SIVEEN, K. S. et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1845, n. 2, p. 136–54, abr. 2014.

SOARES, A. B. et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in recurrent pleomorphic adenoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 8, p. 623–9, set. 2009.

SOARES, A. B. et al. The increased PDGF-A, PDGF-B and FGF-2 expression in recurrence of salivary gland pleomorphic adenoma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 65, n. 3, p. 272–7, mar. 2012.

SOARES, E. C. S. et al. Adenoid cystic carcinoma of the tongue: case report and literature review. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 13, n. 8, p. E475–8, ago. 2008.

SONG, L. et al. Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. **Oncogene**, v. 22, n. 27, p. 4150–4165, jul. 2003.

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. 1159–68, abr. 2013.

SONG, Y.; ZUO, Y. Occurrence of HHIP gene CpG island methylation in gastric cancer. **Oncology Letters**, v. 8, n. 5, p. 2340–2344, nov. 2014.

STENMAN, G.; PERSSON, F.; ANDERSSON, M. K. Diagnostic and therapeutic implications of new molecular biomarkers in salivary gland cancers. **Oral Oncology**, v. 50, n. 8, p. 683–90, ago. 2014.

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. **The Journal of Pathology**, v. 199, n. 4, p. 488–95, abr. 2003.

SUBRAMANIAM, A. et al. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1835, n. 1, p. 46–60, jan. 2013.

TARSITANO, A. et al. Metastasizing “benign” pleomorphic salivary adenoma: A dramatic case-report and literature review. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, p. 1–4, 14 jan. 2014.

TOFTGARD, R. Hedgehog signalling in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 57, n. 12, p. 1720–1731, 2000.

TRIANAFILLIDOU, K. et al. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. **Oral Diseases**, v. 12, n. 4, p. 364–70, jul. 2006a.

TRIANAFILLIDOU, K. et al. Management of adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 7, p. 1114–20, jul. 2006b.

TROSMAN, S. et al. Unknown primary mucoepidermoid carcinoma: Diagnosis and treatment. **Head & Neck**, v. 9409, n. 216, p. E22-25, maio 2014.

- TZELEPI, V. et al. Expression of hedgehog pathway components in prostate carcinoma microenvironment: shifting the balance towards autocrine signalling. **Histopathology**, v. 58, n. 7, p. 1037–47, jun. 2011.
- VARGHESE, B. T. et al. Pleomorphic adenoma of minor salivary gland in the parapharyngeal space. **World journal of Surgical Oncology**, v. 1, n. 1, p. 2, fev. 2003.
- VIDYALAKSHMI, S.; ARAVINDHAN, R. Adenoid cystic carcinoma of the buccal mucosa: a case report with review of literature. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 8, n. 3, p. 266–8, mar. 2014.
- WAAL, J. E. VAN DER, SNOW, J. B.; WAAL, I. VAN DER. Intraoral adenoid cystic carcinoma. The presence of perineural spread in relation to site, size, local extension, and metastatic spread in 22 cases. **Cancer**, v. 66, n. 9, p. 1–3, nov. 1990.
- WAN, J. et al. Sonic hedgehog pathway contributes to gastric cancer cell growth and proliferation. **Bio Research Open Access**, v. 3, n. 2, p. 53–9, 1 abr. 2014.
- WANG, Y. F. et al. Expression of hedgehog signaling molecules as a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. **Head & Neck**, v. 34, n. 11, p. 1556-61, nov. 2012.
- WANG, Z. et al. Significance and prognostic value of Gli-1 and Snail/E-cadherin expression in progressive gastric cancer. **Tumour Biology**, v. 35, n. 2, p. 1357–63, fev. 2014.
- WANG, Z. C. et al. Aberrant expression of sonic hedgehog pathway in colon cancer and melanosis coli. **Journal of Digestive Diseases**, v. 14, n. 8, p. 417–24, ago. 2013.
- WEI, Q. et al. IMP3 expression is associated with poor survival in cervical squamous cell carcinoma. **Human Pathology**, v. 45, n. 11, p. 2218-24, jul. 2014.
- WONG, S. Y.; REITER, J. F. The primary cilium at the crossroads of mammalian hedgehog signaling. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 85, p. 225-260, 2009.
- XIAO, H. et al. A Novel Small Molecular STAT3 Inhibitor, LY5 Inhibits Cell Viability, Cell Migration, And Angiogenesis in Medulloblastoma Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 0–30, 13 out. 2014.
- XU, X. et al. Activation of the Sonic Hedgehog pathway in thyroid neoplasms and its potential role in tumor cell proliferation. **Endocrine-related Cancer**, v. 19, n. 2, p. 167–79, abr. 2012.
- XU, Y. H.; LU, S. A meta-analysis of STAT3 and phospho-STAT3 expression and survival of patients with non-small-cell lung cancer. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 40, n. 3, p. 311–7, mar. 2014.
- YAN, R. et al. Suppression of growth and migration by blocking the Hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells. **Cellular Oncology**, v. 36, n. 5, p. 421–35, out. 2013.

YANG, L. et al. Hedgehog signaling activation in the development of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of esophagus. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 3, n. 1, p. 46–57, feb. 2012a.

YANG, Q. et al. STAT3 activation and aberrant ligand-dependent sonic hedgehog signaling in human pulmonary adenocarcinoma. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 93, n. 2, p. 227–36, out. 2012b.

YAUCH, R. L. et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. **Nature**, v. 455, n. 7211, p. 406–10, set. 2008.

YIH, W.Y.; KRATOCHVIL, F. J.; STEWART, J. C. B. Intraoral minor salivary gland neoplasms: review of 213 cases. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 6, p. 805–10, jun. 2005.

YOO, Y. A et al. Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 22, p. 7061–70, 15 nov. 2011.

YU, H.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nature Reviews. Immunology**, v. 7, n. 1, p. 41–51, jan. 2007.

YU, H.; PARDOLL, D.; JOVE, R. STATs in cancer inflammation and immunity : a leading role for STAT3. **Nature Reviews. Cancer**, v. 9, n. 11, nov. 2009.

YUE, D. et al. Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR**, v. 33, n. 1, p. 34, jan. 2014.

ZHONG, Z.; WEN, Z.; DARNELL, J. E. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. **Science**, v. 264, n. 5155, p. 95–8, abr. 1994.

ZHOU, X. et al. Autocrine Sonic hedgehog attenuates inflammation in cerulein-induced acute pancreatitis in mice via upregulation of IL-10. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e44121, jan. 2012.

ANEXOS

Anexo1: Tabela de dados clínicos dos tumores.

Tumor	Caso	Tipo Histológico	Sexo	Idade	Localização	Tamanho (cm)
AP	518/09	-	não disp	não disp	não disp	não disp
AP	2529/08	-	M	59	palato duro	2,6x2,2x1,9
AP	11912/10	-	F	12	parótida	não disp
AP	4689/11	-	F	67	parótida	5,5x3,5x2,0
AP	1941/02	-	M	38	palato duro	3,0x3,0
AP	6590/00	-	M	21	palato mole	3
AP	5911/99	-	F	23	palato duro	5,0x6,0
AP	503/01	-	M	15	palato duro	2,5
AP	10704/10	-	M	28	parótida	não disp
CME	132/02	Baixo	M	não disp	parótida	4x3x2
CME	3796/11	Baixo	F	78	palato duro	3x1
CME	141/12	Baixo	M	18	palato duro	3,8x2x1
CME	1567/14	Intermediário	M	78	ponta da língua	não disp
CME	5438/03	Alto	M	55	parótida	6x4x2,5
CME	2904/04	Alto	M	31	parótida	4,5x3,5x3,2
CME	9842/05	Intermediário	F	33	parótida	10x9,5x3,5
CME	11348/06	Intermediário	não disp	não disp	não disp	não disp
CME	5609/04	Baixo	F	26	palato duro	1,5
CME	7091/04	Intermediário	M	22	parótida	6,5x5,5x5
CME	1216/04	Baixo	F	71	palato	1
CME	B994807	Alto	M	31	língua	2
CME	321129	Alto	M	57	palato mole	5
CME	320126	Alto	M	58	hipofaringe	2x0,4x0,3
CME	317669	Alto	F	55	glândula sub-lingual	3,8x3,5x2,7
CME	BA44487B2	Alto	M	53	parótida esq	2x1,5
CME	302721*	Alto	M	65	retro maxilar esq	1,3x1x0,8
CME	B989620	Intermediário	F	não disp	parótida direita	6,5x5,3x2
CME	BA33557	Alto	M	48	parótida direita	6x3,5x3,3
CME	B983426	Alto	M	não disp	língua	5x3,5
CAC	1005438	Sólido	M	42	Base de língua	4,3
CAC	941907	Sólido	M	46	Antro maxilar + osso nasal	8x4x4
CAC	1129162	Sólido	M	32	Parótida esquerda	6x4,5x2,2
CAC	5238/11	Cribriforme	M	59	Lábio superior	0,6x0,5x0,3
CAC	8312/03	Cribriforme	F	28	gengiva	1,4
CAC	2257/00	Cribriforme	M	32	palato mole	2x3
CAC	8263/05	Cribriforme	M	42	não disp	8x6x2,5
CAC	67/11	Cribriforme	M	40	não disp	2x0,6x0,6
CAC	60/10	Sólido	F	64	seio maxilar esq	2,5x2,5x0,5
CAC	3645/04	Sólido	F	57	submandibular	6,5x4,5x4
CAC	314/09	Cribriforme	não disp	não disp	não disp	não disp
CAC	645/03	Cribriforme	F	35	comissura labial	2
CAC	7439/02	Cribriforme	F	22	assoalho de boca	0,6
CAC	3084/11	Cribriforme	M	60	não disp	2,5x1,8x1,5
CAC	916/03	Tubular	M	47	parótida	5x4x2,2
CAC	338/99	Sólido	M	31	palato mole	2x1,2x0,7
CAC	2647/09	Cribriforme	não disp	não disp	não disp	não disp

Anexo 2: Tabela de escores de intensidade de marcação, de porcentagem de marcação e de índice de marcação.

ESCORE	INTENSIDADE DE MARCAÇÃO
0	Sem coloração
1	Fraca/Discreta
2	Moderada
3	Forte/Intensa

ESCORE	PORCENTAGEM DE MARCAÇÃO
0	0-10%
1	11-25%
2	26-50%
3	51-75%
4	76-100%

Intensidade de Marcação X Porcentagem de Marcação = Índice de Marcação (IM)

ESCORE	EXPRESSÃO	ÍNDICE DE MARCAÇÃO (IM)
-	Negativa	0
+1	Baixa	1 - 4
+2	Alta	5 - 8
+3	Superexpressão	9 - 12