



**UFBA**

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



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA:  
RELAÇÃO COM MOLÉCULAS HEDGEHOG E MMP14**

**VANESSA SOUSA NAZARÉ GUIMARÃES**

**Salvador - Bahia**

**2018**

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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA:  
RELAÇÃO COM MOLÉCULAS HEDGEHOG E MMP14**

**VANESSA SOUSA NAZARÉ GUIMARÃES**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Clarissa Araújo Gurgel Rocha

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Patologia Humana  
para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia**

**2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

G963f Guimaráes, Vanessa Sousa Nazaré.  
Fibroblastos associados ao carcinoma escamocelular de boca: relação com moléculas Hedgehog e MMP14. / Vanessa Sousa Nazaré Guimaráes. - 2018.  
62 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Orientadora: Prof<sup>a</sup> Clarissa Araújo Gurgel Rocha, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Proteínas Hedgehog. 3. Imuno-histoquímica. I. Título.

CDU 616.31-006.6

**"FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA: RELAÇÃO COM  
MOLÉCULAS HEDGEHOG E MMP14"**

**VANESSA SOUSA NAZARÉ GUIMARÃES**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 02 de março de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dra. Clarissa Araújo Gurgel Rocha  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



---

Dr. Jean Nunes dos Santos  
Professor Titular  
UFBA



---

Dr. Daniel Abensur Athanzio  
Professor Adjunto  
UFBA

**Aos meus pais, Cláudio e Ivana**

Alicerce que me permite sonhar e conquistar o mundo.  
“Sou mais eu, porque sou vocês”.

**À minha orientadora, Clarissa Gurgel**

Pelo incentivo e oportunidades para seguir em frente.  
Desde a iniciação científica, em 2012, sempre tive a  
certeza que tinha uma aliada para conquistar as etapas  
em busca do meu sonho!!

## **AGRADECIMENTOS**

**À Deus,**

Por cada amanhecer e pela paz que habita em mim.

**Aos meus pais, Cláudio e Ivana,**

Por todo amor e valores. Minha base, meu chão. Amo vocês!!

**À minha avó, Valda,**

Pelo amor, carinho e denço de sempre.

**Ao meu noivo, Anderson,**

Meu parceiro nessa e em tantas outras jornadas... Eu que sempre fui única, hoje penso a vida para dois. Te amo!

**A minha orientadora Prof.<sup>a</sup>. Clarissa Gurgel,**

Se eu já tinha motivos para agradecer, nessa dissertação a gratidão cresceu exponencialmente. Muito obrigada por participar e contribuir ativamente para minha formação profissional, por estar sempre disponível e acreditar em mim.

**Ao Prof. Jean Nunes,**

Pela disponibilidade, mesmo com tantas outras importantes funções, para participar deste trabalho e por me transmitir muitos ensinamentos de forma descontraída.

**À Marbele Guimarães,**

Pela colaboração para a obtenção dos casos para este trabalho e tornar a distância Salvador – Feira tão agradável.

**Ao Centro de Diagnóstico Pires (CEDAPI),**

Agradeço ao Dr. Bruno Pires, Diogo e toda equipe CEDAPI, não apenas pela obtenção da casuística, fundamental para a execução deste trabalho. Mas também, pela boa vontade e hospitalidade.

**A minha família,**

Tios e primos que sempre torcem pelo meu sucesso. Em especial, Gil e André, pessoas queridas que sempre demonstram orgulho a cada etapa concluída.

**Às minhas “migas”,**

Amigas da minha vida, minhas primeiras “alunas”, que, desde a infância, apoiam o meu sonho pela docência.

**Às minhas “pinks”,**

Vivenciaram comigo o início da minha trajetória acadêmica e sempre me incentivaram a seguir meu sonho. Obrigada por compartilharem comigo tanta felicidade a cada etapa vencida.

**Aos colegas de turma,**

Especialmente para Rai e Jeu, pela convivência e parceria que vai além das disciplinas.

**À Mamanu,**

Revisora oficial do meu conteúdo científico. Peça chave desde a confecção do projeto até a elaboração desta dissertação.

**À Rol, Rô e Lud,**

Pelo agradável convívio ao longo destes mais de 5 anos de vida científica.

**Ao grupo Biopatologia,**

Em especial, a Renatinha, pelo auxílio desde o processamento dos casos até as imunoss.

**Ao Hospital AC. Camargo,**

Representado por Dr. Fernando e Marina, pelo escaneamento das lâminas.

**À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA),**

Minha segunda casa, sou grata pela minha formação.

**À equipe de Radiologia da FOUFBA,**

Em especial, Prof<sup>ª</sup>. Iêda e Prof. Frederico, que contribuíram na minha formação e despertaram em mim o amor pela Radiologia.

**Ao curso de Pós-Graduação em Patologia Humana,**

Aos professores do curso na minha formação e as meninas da secretaria que sempre estão disponíveis na solução das minhas demandas.

**Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM),**

Em especial, Dr. Mittermayer, Eliana, Theomira, e Cleiton por toda ajuda.

**Ao IGM,**

Centro de pesquisa referência que tanto contribui para na minha evolução profissional.

**À Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna do IGM,**

Em especial, à Ana Maria Fiscínia, pela zelosa correção desta dissertação.

**Ao Conselho Nacional em Pesquisa (CNPq),**

Pelo apoio financeiro na concessão da bolsa.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus  
sonhos.”

*Eleanor Roosevelt*

GUIMARÃES, Vanessa Sousa Nazaré. Fibroblastos associados ao carcinoma escamocelular de boca: relação com moléculas Hedgehog e MMP14. 62 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Os Fibroblastos Associados ao Câncer (FACs) representam a população celular mais abundante do estroma e favorecem a progressão tumoral, através da regulação de vias de sinalização, como a Hedgehog (HH), e de mecanismos de invasão tumoral. A desregulação da via HH é um importante mecanismo na patogênese do câncer e esta via foi demonstrada ativada no Carcinoma Escamocelular de Boca (CEB), que é a neoplasia maligna mais comum na região de cabeça e pescoço.

**OBJETIVO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a população de fibroblastos associados ao câncer e a sua relação com moléculas Hedgehog (SHH, IHH e GLI1) e expressão de MMP14, em CEB

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Setenta casos de CEBs e dez amostras de margens tumorais (MAT) foram submetidos à reação imuno-histoquímica para as proteínas  $\alpha$ -SMA, S100A4/FSP1, FAP, SHH, IHH, GLI1 e MMP14 utilizando o sistema polimérico Advance<sup>TM</sup>. A co-localização das proteínas  $\alpha$ -SMA/SHH,  $\alpha$ -SMA/MMP14, S100A4/SHH e S100A4/MMP14 foi avaliada através de dupla marcação imuno-histoquímica. As análises das proteínas foram realizadas em pelo menos 3 áreas coincidentes de cada caso, de acordo com os parâmetros semi-quantitativos descritos por Gurgel et al. (2008). A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism versão 6.03 e o SPSS versão 17.0.

**RESULTADOS:** Quarenta e cinco CEBs (64,28%) foram positivos para a proteína  $\alpha$ -SMA exclusivamente em estroma, sendo o escore 3+ predominante (n=24; 53,33%). Considerando apenas o estroma tumoral, a proteína S100A4 foi identificada em 94,28% dos casos (n=66) do escore 3+ (n=41; 62,13%) e FAP em treze casos (18,57%), sendo o escore 1+ (n=6, 46,16%) predominante. Observou-se uma correlação positiva entre os níveis de  $\alpha$ -SMA/S100A4 ( $p < 0,0001$ ;  $\phi = 0,24$ ) e  $\alpha$ -SMA/FAP ( $p < 0,0001$ ;  $\phi = 0,55$ ) e negativa entre S100A4/FAP ( $p < 0,0001$ ;  $\phi = -0,62$ ). Considerando apenas as células tumorais, sessenta e quatro (91,43%) CEBs foram positivos para a proteína SHH, com predomínio do escore 3+ (n=50; 78,13%); para IHH, foi observada positividade em 40% dos casos (n=28) com maior prevalência do escore 2+ (n=10; 35,72%) e cinquenta e cinco (78,57%) casos foram GLI1 positivos com maior prevalência do escore 3+ (n=28; 50,91%). Houve correlação positiva entre a imunexpressão de SHH e IHH com  $\alpha$ -SMA ( $p < 0,0001$ ,  $\phi = 0,51$ ;  $p = 0,0094$ ,  $\phi = 0,60$ ), SHH/S100A4 ( $p = 0,087$ ,  $\phi = 0,94$ ) e IHH com FAP ( $p = 0,0003$ ,  $\phi = 0,98$ ). Correlação negativa foi observada entre SHH/FAP ( $p < 0,0001$ ,  $\phi = -0,42$ ) e IHH/S100A4 ( $p < 0,0001$ ;  $\phi = -0,51$ ). A proteína MMP14 foi identificada em células tumorais de cinquenta e cinco casos (78,57%) e apresentou correlação positiva com SHH ( $p = 0,019$ ,  $\phi = 0,98$ ), GLI1 ( $p = 0,95$ ,  $\phi = 0,99$ ) e  $\alpha$ -SMA ( $p = 0,27$ ,  $\phi = 0,66$ ) e S100A4 ( $p = 0,016$ ,  $\phi = 0,87$ ) e negativa com IHH ( $p < 0,0001$ ,  $\phi = -0,15$ ) e FAP ( $p < 0,0001$ ;  $\phi = -0,25$ )

**CONCLUSÕES:** Nossos resultados indicam uma heterogeneidade imunofenotípica dos FACs em CEBs. E, demonstram que os FACs são potencial fonte de ligantes HH (SHH e IHH) no estroma tumoral, bem como podem responder a sinalização mediada pelas células tumorais, através de GLI1. Observamos também que uma maior quantidade de SHH e IHH em células de CEB estavam associadas a uma maior densidade de FACS, corroborando para a função quimioatratadora destas moléculas. Por fim, o aumento de moléculas HH e FACS está correlacionado a uma maior imunexpressão de MMP14, contribuindo para o fenótipo invasor.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas, Proteínas Hedgehog, Imuno-histoquímica

GUIMARÃES, Vanessa Sousa Nazaré. Oral squamous cell carcinoma-associated fibroblasts: Association with Hedgehog signaling molecules and MMP14. 62 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are the major component of cancer stroma. CAFs play an essential role in tumor progression by regulating signaling pathways, such as Hedgehog (HH), and supporting invasion mechanisms. Abnormal activation of the HH pathway is a relevant mechanism related to carcinogenesis. This pathway has been demonstrated to be activated in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), which is the most common malignant neoplasia in the head and neck region. **AIM:** The aim of this study was to investigate CAFs in human OSCC, and evaluate the relationship between CAFs, Hedgehog molecules (SHH, IHH and GLI1) and MMP14 expression. **MATERIALS AND METHODS:** A total of 70 samples of OSCC and 10 samples of tumor margins were evaluated on this study. The expression of  $\alpha$ -SMA, S100A4 / FSP1, FAP, SHH, IHH, GLI1, and MMP14 was assessed by immunohistochemistry on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using the Advance™ polymer system. Co-localization of the  $\alpha$ -SMA / SHH,  $\alpha$ -SMA / MMP14, S100A4 / SHH and S100A4 / MMP14 proteins was assessed by double immunohistochemical labeling. Protein analyzes were performed in at least 3 matched areas of each case, according to the semi-quantitative parameters described by Gurgel et al. (2008). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 6.03 and SPSS version 17.0. **RESULTS:** Forty-five OSCCs (64.28%) were positive for  $\alpha$ -SMA protein exclusively in stroma, with a predominant 3+ score (n = 24; 53.33%). Considering tumor stroma, S100A4 was identified in 94.28% of the cases (n = 66) of the 3+ score (n = 41, 62.13%) and FAP in 13 cases (18.57%). the predominant score 1+ (n = 6, 46.16%). There was a positive correlation between  $\alpha$ -SMA / S100A4 (p <0.0001;  $\phi$  = 0.24) and  $\alpha$ -SMA / FAP (p <0.0001;  $\phi$  = 0.55) and negative S100A4 / FAP (p <0.0001;  $\phi$  = -0.62). Considering tumor cells, sixty-four (91.43%) OSCCs were positive for SHH protein, with a predominance of the 3+ score (n = 50; 78.13%); (n = 28) with a higher prevalence of 2+ scores (n = 10; 35.72%) and fifty-five (78.57%) cases were GLI1 positive with a higher prevalence of the 3+ score (n = 28; 50.91%). There was a positive correlation between SHH and IHH immunoreexpression with  $\alpha$ -SMA (p <0.0001,  $\phi$  = 0.51, p = 0.0094,  $\phi$  = 0.60), SHH / S100A4 (p = 0.087,  $\phi$  = 0.94) and IHH with FAP (p = 0.0003,  $\phi$  = 0.98). Negative correlation was observed between SHH / FAP (p <0.0001,  $\phi$  = -0.42) and IHH / S100A4 (p <0.0001;  $\phi$  = - 0.51). The MMP14 protein was identified in tumor cells from fifty-five cases (78.57%) and showed a positive correlation with SHH (p = 0.019,  $\phi$  = 0.98), GLI1 (p = 0.95,  $\phi$  = 0.99) and  $\alpha$ -SMA (p = 0.27,  $\phi$  = 0.66) and S100A4 (p = 0.016,  $\phi$  = 0.87) and negative with IHH (p <0.0001,  $\phi$  = -0.15). **CONCLUSIONS:** Our study provides evidence for the existence of an immunophenotypic heterogeneity of CAFs in OSCCs. Our findings demonstrated that these cells are a potential source of HH ligands (SHH and IHH) in tumor stroma, and also can respond to tumor-mediated signaling through GLI1. We also observed that a greater amount of SHH and IHH in OSCC cells were associated with a higher density of CAFs, corroborating to the chemoattractant function of these molecules. Finally, the increase of HH and CAFs molecules is correlated to a greater immunoreexpression of MMP14, contributing to the invading phenotype.

**Palavras-chave:** Squamous cell carcinoma, Hedgehog proteins, Immunohistochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Via Hedgehog	17
<b>Figura 2</b>	Ativação da via Hedgehog	18
<b>Figura 3</b>	Imunoexpressão <i>in vitro</i> dos ligantes HH em FACs de CEBs	19
<b>Figura 4</b>	Possíveis origem dos fibroblastos associados ao câncer	21
<b>Figura 5</b>	Via Hedgehog em fibroblastos associados ao câncer	22
<b>Figura 6</b>	Ativação dos fibroblastos associados ao câncer em CEB	23
<b>Figura 7</b>	Imunoexpressão das proteínas $\alpha$ -SMA, S100A4 e FAP em CEBs e MATs.	33
<b>Figura 8</b>	Associação dos marcadores $\alpha$ -SMA, S100A4, FAP, SHH, IHH e GLI1 em CEBs e MATs	36
<b>Figura 9</b>	Imunoexpressão de SHH, IHH e GLI 1 em CEBs e MATs	37
<b>Figura 10</b>	Imunoexpressão dos ligantes HH e marcadores para FACs em CEBs	38
<b>Figura 11</b>	Co-localização das proteínas $\alpha$ -SMA /SHH e S100A4/SHH	39
<b>Figura 12</b>	Co-localização das proteínas $\alpha$ -SMA /MMP14 e S100A4/MMP14 em CEBs	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Critérios utilizados para a inclusão e exclusão da casuística	26
<b>Tabela 2</b>	Dados do fabricante, clone, recuperação antigênica e diluição dos anticorpos	28
<b>Tabela 3</b>	Interpretação para valores de Coeficiente de $\phi$ (Phi)	29
<b>Tabela 4</b>	Características clínicas e gradação histológica de 70 pacientes com CEB	30
<b>Tabela 5</b>	Escore semi-quantitativos dos marcadores de fibroblastos em CEBs	32
<b>Tabela 6</b>	Escore semi-quantitativos dos componentes da via HH em CEBs	35
<b>Tabela 7</b>	Escore semi-quantitativos da proteína MMP14 em CEBs	40

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\alpha$ - SMA	Refere-se a proteína <i>alpha smooth muscle Actin</i>
ALDH1	Do inglês, <i>AldehydeDehydrogenase 1</i>
BDNF	Do inglês, <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
b-FGF	Do inglês, <i>Basic fibroblast growth factor</i>
BMP4	Refere-se a proteína <i>Bome morphogenetic protein 4</i>
CCL2	Do inglês, <i>C-C motifchemokine ligand 2</i>
CCL7	Do inglês, <i>C-C motifchemokine ligand 7</i>
CEB	Carcinoma Escamocelular de boca
COX - 2	Ciclooxigenase-2
CTT	Células-tronco tumorais
CXCL	Do inglês, <i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
DEO	Displasia epitelial oral
DHH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Desert Hedgehog</i>
EGFR	Do inglês, <i>epidermel growth factor</i>
FAP	Refere-se a proteína <i>fibroblast activation protein</i>
FAC	Fibroblasto associado ao câncer
FGF	Do inglês, <i>fibroblast growth factor</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FSP1	Refere-se a proteína <i>Fibroblast specific protein 1</i>
KGf	Do inglês, <i>Keratinocyte growth factor</i>
GLI1	Refere-se a proteína ou gene <i>GLI Family zinc finger 1</i>
GLI2	Refere-se a proteína ou gene <i>GLI Family zinc finger 2</i>
GLI3	Refere-se a proteína ou gene <i>GLI Family zinc finger 3</i>
GLUT-1	Do inglês, <i>Glucose transporter 1</i>
HGF	Do inglês, <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HH	Hedgehog
HPV	Papiloma Vírus Humano
IGF	Do inglês, <i>Insulin-like growth factor</i>

IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IHH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Indian Hedgehog</i>
IL	Refere-se a interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAT	Margem adjacente ao tumor
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
NF-K $\beta$	Do inglês, <i>factor nuclear kappa B</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
p16	Refere-se a proteína p16
p53	Refere-se a proteína p53
PDGF	Do inglês, <i>Platelet-derived growth factor</i>
PGE2	Refere-se a prostaglandina E2
PTCH1	Refere-se ao gene ou proteína <i>Patched 1</i>
RANK	Do inglês, <i>Receptor Activator of Nuclear Factor <math>\kappa</math> B</i>
S100A4	Do inglês, <i>S100 calcium binding protein A4</i>
SDF1	Do inglês, <i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SFRP-1	Refere-se a proteína <i>secreted frizzled related protein 1</i>
SHH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Sonic Hedgehog</i>
SMO	Refere-se ao gene ou proteína <i>Smoothed</i>
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TGF- $\beta$	Do inglês, <i>Transforming growth factor beta</i>
TNF	Do inglês, <i>Tumor necrosis factor</i>
VEGF	Do inglês, <i>vascular endothelial growth factor</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	
1.1	CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA	14
1.2	VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG	16
1.3	FIBROBLASTOS ASSOCIADO AO CÂNCER	19
1.3.1	Aspectos Gerais	19
1.3.2	Facs em Câncer de Boca	23
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	24
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b>	25
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	25
4.1	OBJETIVO GERAL	25
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	26
5.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	26
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E CASUÍSTICA	26
5.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA	27
5.4	TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA	27
5.5	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	28
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	30
6.1	CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DA POPULAÇÃO DE FIBROBLASTOS	30
6.2	$\alpha$ -SMA	30
6.3	S100A4	31
6.4	FAP	31
6.5	ASSOCIAÇÃO ENTRES OS MARCADORES DE FACS	32
6.6	CARACTERIZAÇÃO DE COMPONENTES HEDGEHOG	34
6.7	SHH	34
6.8	IHH	34
6.9	GLI1	35
6.10	ASSOCIAÇÃO ENTRE LIGANTES HH (CÉLULAS TUMORAIS) e FACS	38
6.11	ASSOCIAÇÃO COM INVASÃO TUMORAL	40
6.12	MMP14	40
6.13	ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES MMP14, HH, $\alpha$ -SMA, S100A4 e FAP	40
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	42
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	46
	<b>REFERÊNCIAS</b>	47
	<b>ANEXOS</b>	59

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA

O Carcinoma Escamocelular de Boca (CEB) é a neoplasia maligna mais comum na região de cabeça e pescoço (com exceção do câncer de pele não-melanoma), acometendo mais de 300 mil indivíduos por ano, em todo o mundo (FERLAY et al., 2012). No Brasil, estima-se cerca de 15 mil novos casos e, na região Nordeste, o câncer de boca é o 5º mais frequente. Nesta região, a Bahia é o estado com maior prevalência desta doença com incidência de 760 casos por ano, sendo 550 homens e 210 mulheres (BRASIL, INCA, 2018). O CEB é uma neoplasia agressiva que acomete principalmente homens, tabagistas e etilistas, entre a quinta e sexta década de vida, sendo comum a invasão local e metástase (RODRIGUES et al., 2014; XU et. al, 2017; OMS, 2017).

A gradação histológica dos CEBs baseia-se nas alterações morfológicas e arquiteturais das células tumorais, sendo classificada em bem, moderadamente e pouco diferenciado (OMS, 2017). No entanto, a diferenciação histológica, de forma isolada, não está associada com o prognóstico do paciente. A extensão anatômica da lesão, metástase e comprometimento de estruturas adjacentes, hábitos e expressão de p16 (SGARAMELLA et al., 2015; MAZUL et al., 2016; CHEN et al., 2017; XU et al., 2017), também são importantes para o desfecho da doença. O tabagismo crônico é o principal fator etiológico e há uma relação dose-dependente, já o consumo de álcool atua de forma sinérgica, potencializando o risco inerente ao hábito de fumar (CHI et al., 2015). Infecções pelos vírus HPV, principalmente o subtipo 16, estão relacionados como fator etiológico em 3% dos casos de CEBs (CHI et al., 2015; MAZUL et al., 2016). Outros fatores, como alterações genéticas, falta de higiene bucal e dietas pobres em frutas e vegetais estão associados ao CEB, mas ainda sem risco direto estabelecido (FARQUHAR et al., 2017).

O processo de carcinogênese inicia a partir de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas nas células escamosas da mucosa oral, que culmina em expansão clonal das células malignas. Em adição, em outros sítios anatômicos adjacentes ao tumor primário estabelecido, pode existir uma população de células geneticamente alteradas, mas fenotipicamente normais (MOHAN e JAGANNATHAN, 2014), corroborando com a teoria do *Field Cancerization* em tumores orais (SLAUGHTER, 1953), a qual enfatiza que áreas

adjacentes ao tumor também estão passíveis da ação dos carcinógenos e podem apresentar alterações moleculares e celulares anteriormente a detecção do carcinoma (LEOVIC et al., 2012).

Os CEBs podem ocorrer em qualquer região da mucosa oral, no entanto, os sítios anatômicos mais acometidos por esta neoplasia são: língua (2/3 anteriores), assoalho bucal e gengiva (CHI et al., 2015; OMS, 2017). Clinicamente, os principais sinais são lesões indolores na cavidade oral que não cicatrizam por mais de 15 dias, apresentando coloração avermelhada ou esbranquiçada (ADRIEN et al., 2014; INCA, 2016). A depender da localização e extensão do tumor primário e do status dos linfonodos cervicais, o tratamento do câncer da cavidade bucal pode ser cirúrgico, radioterápico ou uma combinação de ambos. Apesar dos avanços científicos relacionados a biologia dos CEBs, estes ainda não impactaram positivamente na abordagem terapêutica e o prognóstico desta doença (INCA, 2001; INCA, 2016). A ressecção cirúrgica dos tumores resulta em morbidades significativas e a taxa de sobrevida é cerca de 50%, em 5 anos (CHI et al., 2015; CHEN et al., 2017).

Sendo assim, contribuir para os estudos sobre a biologia dos CEB, em especial a busca de biomarcadores para diagnóstico precoce e prognóstico, representa uma prioridade nesta doença. Alguns marcadores, como MMP-2, MMP-1, Caderina-1, Mucina-1, GLUT-1, Mucina-4, IL-8, HPV-16, EGFR e p53, foram sistematicamente estudados, com resultados relacionados ao desfecho da doença (RIVERA et al., 2017). Por outro lado, a pesquisa em câncer, atualmente, busca relacionar as alterações genéticas, epigenéticas e relacionadas as interações heterotípicas com células do estroma tumoral, através da contextualização com as vias de sinalização que podem estar alteradas nas células malignas e estromais.

Estudos prévios da nossa equipe (CAVICCHIOLI BUIM et al., 2011; DIAS et al., 2016; VALVERDE et al., 2016) demonstram que a via HH está reativada e tem participação na patogênese de CEBs (CAVICCHIOLI BUIM et al., 2011). As células tumorais ou estromais, a exemplo os macrófagos CD163+, produzem os ligantes HH e ativam esta cascata em células tumorais por mecanismos de sinalização autócrino e parácrino, respectivamente. Assim como, podem estar relacionadas à ativação estromal, onde já está descrito que as células endoteliais são responsivas e apresentam a via HH reativada (VALVERDE et al., 2016).

## 1.2 VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG

Vias de sinalização que participam do desenvolvimento embrionário, como a Hedgehog (HH), são normalmente mantidas em estado inativo em tecidos adultos e a reativação desta está associada ao desenvolvimento tumoral (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; AMAKYE et al., 2013). A via HH foi inicialmente descrita em *Drosophila* (NÜSSLEIN-VOLHARD, 1980) e é fundamental para o desenvolvimento embrionário normal, participando da formação do tubo neural, esqueleto axial, sistema límbico, pulmão, pele, folículo piloso e dentes (HARDCASTLE et al.; 1998, ST-JACQUES et al., 1998). Somado a isso, tem um papel essencial para o desenvolvimento e ossificação craniofacial e a sua desregulação está associada a um conjunto de patologias craniofaciais incluindo ciclopia, hipertelorismo e holoprosencefalia (BELLONI et al.; 1996, ROESSLER et al.; 1996).

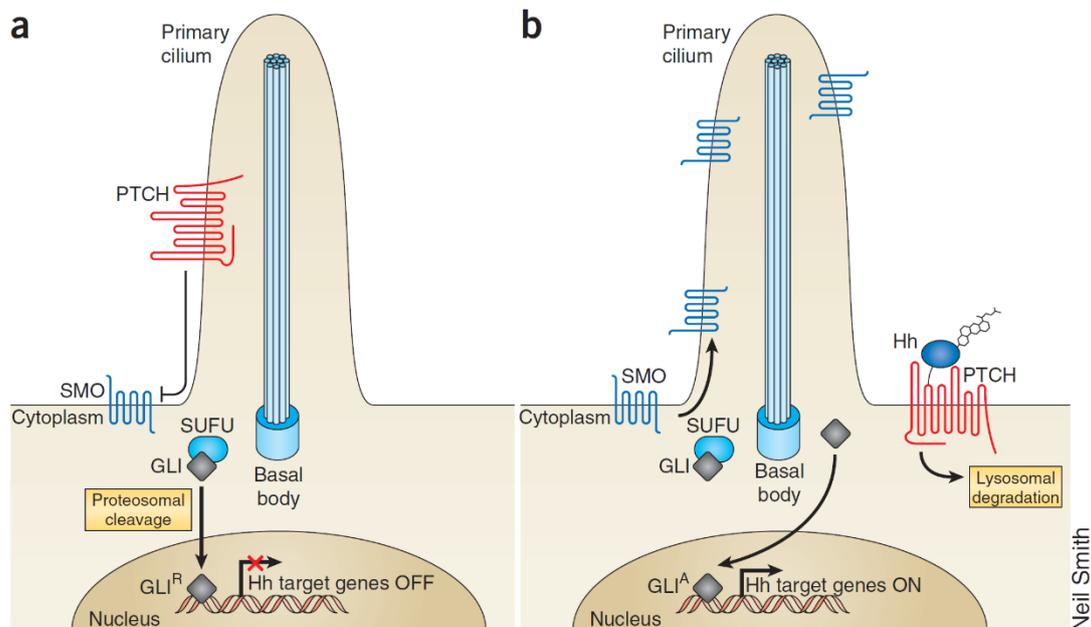
Em mamíferos, os principais componentes da via HH são as proteínas Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) ou Desert Hedgehog (DHH) que atuam como ligantes; o receptor de membrana Patched 1 (PTCH1), regulador negativo da via; a proteína Smoothened (SMO), regulador positivo, e os fatores de transcrição da família GLI1, GLI2 que apresentam uma ação ativadora e GLI3 atua com uma ação repressora (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; AMAKYE et al. 2013). Estes componentes estão, em grande parte, concentrados em uma extensão subcelular da membrana que apresenta filamentos de tubulina, denominada cílio primário (CORBIT et al., 2005).

De forma clássica, a ativação canônica para a transcrição de GLI ocorre por meio da interação ligante-receptor a via HH. Esta é ativada através da ligação das proteínas SHH, IHH ou DHH ao receptor de membrana PTCH1 como ilustrado na Figura 1. Na ausência do ligante, PTCH1 mantém-se no cílio primário e inibe o co-receptor SMO. Os fatores de transcrição GLI mantêm-se no citoplasma por mediadores proteicos (SUFU, PKA), onde após clivagem proteossomal, resultam em sua forma repressora (GLI<sup>R</sup>), que são translocadas para o núcleo e inibem a expressão dos genes alvos (AMAKYE et al. 2013; ARMAS-LÓPEZ et al., 2017).

A ligação de um dos morfógenos HH ao PTCH1 promove ativação da via HH, esse complexo se desloca do cílio primário para a membrana plasmática, com isso, desfaz o efeito inibitório ocasionando a ativação e acúmulo de SMO no cílio primário. SMO induz reações intracelulares que resultam na ativação da família de fatores de transcrição (GLI<sup>A</sup>) e sua translocação nuclear. No núcleo, GLI<sup>A</sup> induz a transcrição de genes alvos relacionados a sobrevivência, proliferação, angiogênese e invasão, incluindo genes da via como GLI1 e

PTCH1, ocasionando uma retroalimentação, feedback positivo (PETERSON et al., 2012; JUNKER et al., 2014).

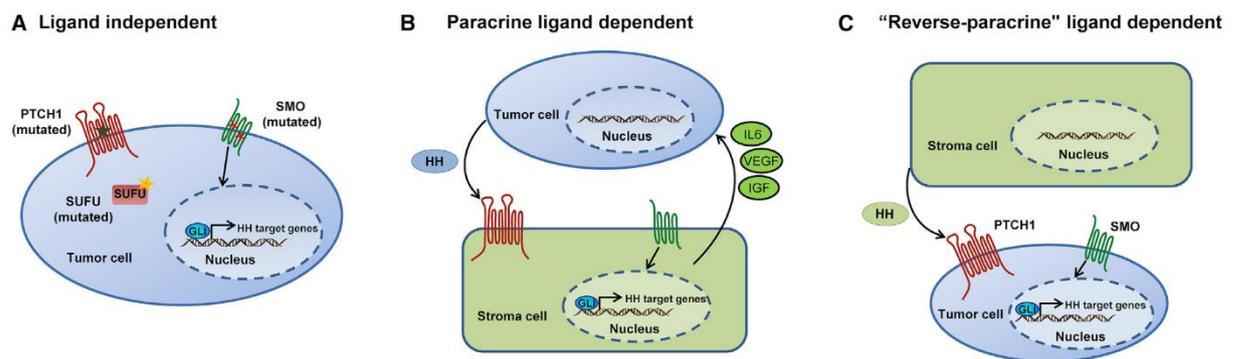
O papel da sinalização HH no câncer foi identificado pela primeira vez em pacientes com síndrome de *Gorlin*, inicialmente descrita em 1960 por GORLIN e GOLTZ. Esta é uma condição rara causada pela mutação de componentes da via HH: PTCH1 (HAHN et al., 1996; JOHNSON et al., 1996) e SUFU (SMITH et al., 2014;). Estas mutações levam a ativação contínua da via HH e a formação de inúmeros carcinomas basocelulares localizados preferencialmente na região de cabeça, pescoço e costas. Esses pacientes, com maior prevalência aos que possuem mutação em SUFU, apresentam maior predisposição a outros tipos de tumores, como o meduloblastoma (PASTORINO et al., 2009; SMITH et al., 2014; FOULKES et al., 2017).



**Figura 1. Via Hedgehog.** (a) Na ausência do ligante HH, PTCH1 localiza-se no cílio primário e inibe a atividade de SMO. O fator de transcrição GLI é mantido no citoplasma, que, após clivagem, e resulta na sua forma repressora GLI<sup>R</sup>. (b) Na presença do ligante, PTCH1 é translocado do cílio, permitindo ativação de SMO e interação com um ligante endógeno, que resulta na translocação nuclear da forma ativadora de GLI e transdução genes alvos da via HH. Fonte: AMAKYE et al., 2013.

Quando a via está ativada através de mecanismos dependentes de ligante, estes podem ser produzidos e secretados tanto por células do parênquima quanto do estroma tumoral. A sinalização autócrina já foi descrita em vários tumores como câncer de cólon (VARNAT et al., 2009), próstata (WALSH, 2005), glioblastomas e meduloblastomas (ZURAWEL et al., 2000), enquanto a via parácrina já foi descrita no câncer de pâncreas e de cólon (TIAN et al., 2009; SCALES e DE SAUVAGE, 2009). Adicionalmente, células do estroma tumoral

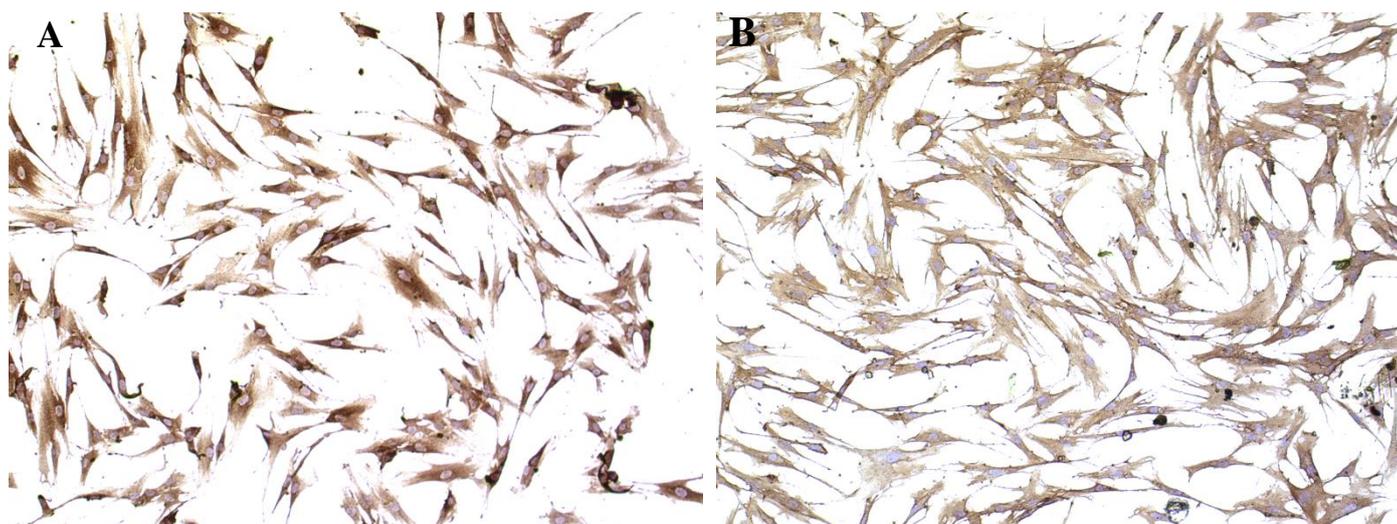
também podem ser fonte de ligantes para ativação da via HH em células malignas, em um mecanismo denominado de sinalização parácrina reversa (THEUNISSEN E DE SAUVAGE, 2009; WU et al., 2017) (Figura 2). Outros meios de ativação da via HH incluem: mutação nos genes SMO, PTCH1 e SUFU, além de mecanismos alternativos (não-canônicos) que ativam os fatores GLI, no contexto de outras cascatas sinalizadoras, como a WNT (PASTORINO et al., 2009; SMITH et al., 2014; FOULKES et al., 2017).



**Figura 2. Ativação da via Hedgehog.** (A) Mutações nos componentes centrais da via HH. (B) Célula tumoral produz o ligante que ativa a via nas células estromais que secreta em resposta a estímulos. (C) Célula estromal produz o ligante e ativa a via HH na célula tumoral. Fonte: Wu et al., 2017.

A via HH tem-se destacado por apresentar um importante papel não somente na iniciação tumoral, através da ativação de genes relacionados a proliferação e sobrevivência celular, manutenção de células tronco e, também, pela evidência crescente da importância das moléculas HH para a ativação do estroma tumoral, angiogênese, invasão, metástase e modulação da resposta imune (PINTER et al., 2013; FAN et al., 2014; VALVERDE et al., 2016).

Estudos prévios conduzidos pela nossa equipe, demonstraram um papel importante da sinalização HH na angiogênese em CEBs, além de identificar macrófagos CD163+ como potenciais fonte de ligantes HH neste tumor (VALVERDE et al., 2016). Nesta mesma linha de investigação, outros trabalhos estão em andamento na equipe e, resultados preliminares dos estudos *in vitro* com Fibroblastos Associados ao Câncer (FAC), mostram que esta célula pode ser fonte ou responsivos aos ligantes, no contexto do CEB (Figura 3) e, portanto, caracterizar imunofenotipicamente essa população de células e entender a relação entre FACs, via HH e células tumorais, em amostras humanas, desperta grande interesse em nosso grupo de pesquisa.



**Figura 3. Imunoexpressão *in vitro* dos ligantes HH em FACs de CEBS.** Imunoexpressão *in vitro* dos ligantes SHH (A) e IHH (B) no citoplasma e membrana de linhagens de FACs isolados de CEBS (Doutorado Ludmila Valverde, em andamento).

### 1.3 FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CÂNCER

#### 1.3.1 Aspectos Gerais

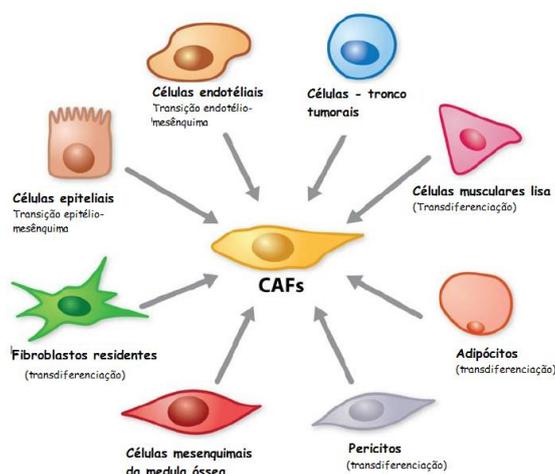
A compreensão de que a iniciação e progressão de tumores não dependem apenas de eventos mutagênicos em células malignas, mas também das interações entre estroma e parênquima, não é recente. O conceito da teoria “*Seed and Soil*” foi proposta há mais de 100 anos (PAGET, 1889), no entanto, por muito tempo os estudos limitaram-se a avaliar o parênquima tumoral. Apenas recentemente, a percepção do câncer tem sido ampliada e compreendida em um contexto de microambiente, onde as células tumorais propriamente ditas interagem com células tidas com os genótipos normais, presentes no estroma tumoral. Estas incluem células do sistema imune, células endoteliais e fibroblastos (HANAHAN, WEINBERG, 2000; PIETRAS e OSTMAN, 2010; HANAHAN, WEINBERG, 2011; HANAHAN, COUSSENS, 2012).

Já em 1971, GABBIANI, RYAN E MAJNO descreveram a presença de fibroblastos modificados na cicatrização de feridas e denominou estas células de miofibroblastos, devido à sua semelhança com células musculares lisas. No câncer, esses fibroblastos modificados apresentam como sinônimos: fibroblastos associados ao tumor, fibroblastos ativados e fibroblastos associados ao câncer (FAC). Quando comparado aos miofibroblastos normais, os FACs apresentam características funcionais distintas, tais como aumento da força contrátil (BAGUL, 2015), na taxa de proliferação, da produção de colágeno, da secreção de fatores de

crescimento e outros moduladores da matriz extracelular (MEC), os quais podem atuar de forma autócrina e parácrina, no contexto da progressão e invasão tumoral (COSTEA et al., 2013).

Por serem células plásticas, os FACs podem apresentar diferentes fenótipos e, por isso, a combinação de biomarcadores permite melhor caracterizar a diversidade destas populações em tumores, já que os marcadores comumente utilizados podem identificar mais de um tipo celular. O  $\alpha$ -SMA é o mais utilizado para a detectar os miofibroblastos (HUANG et al., 2010). Entretanto, este marcador também identifica outros tipos celulares, como: pericitos, células musculares lisas, células mioepiteliais e miofibroblastos relacionados ao processo de cicatrização (GASCARD e TLSTY, 2016). A proteína S100A4 (FSP1) também é utilizada para detectar populações de FAC, porém é observada em células malignas em transição epitélio-mesênquima (TEM), macrófagos, células endoteliais e neurônio (ÖHLUND et al., 2014; GASCARD e TLSTY, 2016). Em adição, há ainda a Proteína de Ativação de Fibroblastos (FAP), a qual pode ser detectada não somente em FAC, mas também em células musculares lisas, pericitos e células epiteliais (LIAO et al., 2013; LIN et al., 2017). Bem como, outros marcadores mesenquimais, como: tenascina-C, periostina, NG-2 (antígeno neuro-glial 2), receptor de PDGF $\alpha$  / b vimentina, colágeno tipo I e prolyl 4-hidroxilase (SUGIMOTO et al., 2006; PRIME et al., 2017).

Os FACs podem se diferenciar a partir de diversos tipos celulares, como células tronco tumorais ou células mesenquimais da medula óssea (SONG et al. 2005, WORTHLEY et al., 2009; QUANTE et al., 2011), células somáticas diferenciadas, a exemplo dos pericitos (GORITZ et al., 2011), células musculares lisas, pré-adipócitos (JOTZU et al, 2011), fibroblastos residentes (MUELLER et al., 2007), células malignas (PETERSEN et al., 2003; MINK et al., 2010) e células endoteliais (ZEISBERG et al, 2007) (Figura 5).

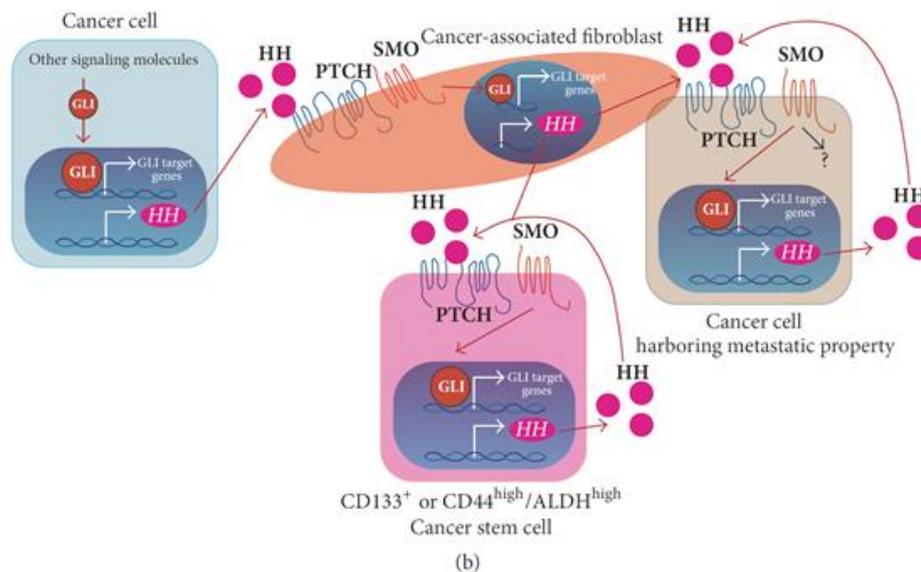


**Figura 4. Possíveis origens dos fibroblastos associados ao câncer.** Fonte: TAKEBE et al., 2011.

A ativação dos FACs é um processo complexo e que envolve alterações na expressão gênica reguladas por microRNA e mudanças epigenéticas (exemplo, hipometilação de DNA global) (ÖHLUND et al., 2014), mediadas principalmente por TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1  $\alpha/\beta$  (JUNG et al., 2010; LEEF e THOMAS., 2013; PRIME et al., 2017), PDGF- $\alpha/\beta$  (SHAO et al., 2000), FGF (STRUTZ et al., 2000) ou IL-6 (GIANNONI et al., 2010) liberados pelas células tumorais.

No contexto da tumorigênese, os FACs contribuem para a angiogênese tumoral afetando, inclusive, a resposta a terapia anti-VEGF, através da ativação de PDGF-C (CRAWFORD et al., 2009). Também participam da regulação do sistema imune através da secreção de quimiocinas pró e anti-inflamatórias (CXCL1, CXCL5, CCL2, NF-K $\beta$ , SDF-1 / CXCL-12, FGF-2, VEGF, IGF-2, HGF, SFRP-1) (CHENG et al, 2008; EREZ et al, 2010; DE PALMA et al., 2017). Esses mediadores podem afetar diretamente o perfil proliferativo e potencial de invasão tumoral (BAGUL et al., 2015; ISHII et al., 2015; JUNG, KIM e KOO, 2015), uma vez que os FACs produzem também o BDNF (DUDÁS et al., 2011), HGF (LEWIS et al., 2004), IGF2, BMP4, CCL7 (JUNG et al., 2009; LEEF e THOMAS, 2013), MMPs 1, 2, 3, 9, 13 e 14 (JUNG et al., 2010; DUDÁS et al., 2011; LEEF e THOMAS, 2013; LEWIS et al., 2004). Adicionalmente, GLENTIS et al., 2017, demonstraram que os FACs podem favorecer a invasão de células malignas, através de forças mecânicas que promovem a formação de lacunas em membrana basal e, conseqüentemente, facilitando a migração das células malignas.

Nos últimos dez anos, alguns autores têm descrito a participação da via HH na ativação dos FACs (GASCARD E TLSTY, 2016) e, ainda, na produção de ligantes HH que atuam em outros tipos celulares, como a população de células tumorais (ABE e TANAKA, 2017), (Figura 5), favorecendo mecanismos relacionados a progressão tumoral (YAUCH et al., 2008; THEUNISSEN e DE SAUVAGE, 2009; ABE e TANAKA, 2017), tal como a transição epitélio-mesênquima (CHOE et al., 2013) e ativação da via HH em células tumorais (YAUCH et al., 2008; THEUNISSEN e DE SAUVAGE, 2009), corroborando para a proliferação de células malignas, por exemplo (BERMUDEZ et al., 2013; ABE e TANAKA, 2017). Por outro lado, em tumores de bexiga, a expressão de moléculas HH em FACs pode estar relacionada a uma inibição da progressão tumoral inicial, através da ativação de mecanismos de reparo, induzidos por Hedgehog (ROBERTS, KERSHNER e BEACHY, 2017).



**Figura 5. Via Hedgehog em fibroblastos associados ao câncer.** Os FACs podem ter a via HH ativada por morfógenos produzidos pelas células tumorais; podem produzir os ligantes para ativação da via HH em células tumorais como também, podem produzir o ligante para ativação da via HH em outros tipos celulares, como as células tronco tumorais. Fonte: ABE e TANAKA, 2017.

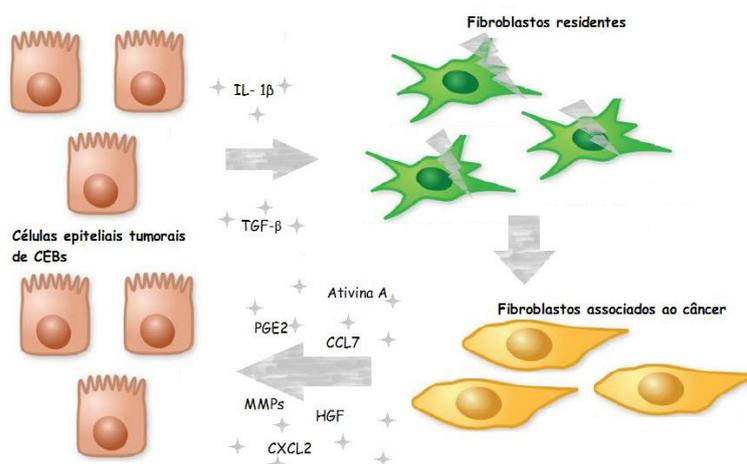
Estudos que isolaram FACs de tumores de mama (ORIMO et al., 2005), próstata (OLUMI et al., 1999), ovário (YANG et al., 2006), pâncreas (HWANG et al., 2008), pele (SNEDDON et al., 2006), cólon (DE WEVER et al., 2004) esôfago (ZHANG et al., 2009) e boca (LIU et al., 2006; SOBRAL et al., 2011a) demonstraram que as subpopulações de FACs são distintas e heterogêneas, com reflexos nas características biológicas secretoras e uma maior diversidade de funções na progressão tumoral.

### 1.3.2 Facs em Câncer de Boca

As primeiras evidências da participação dos miofibroblastos no CEB foram descritas por BARTH et al. (2004). A partir de então, vários estudos vêm tentando desvendar as funções destas células neste tumor e a relação desta população, com as células tumorais. Já foi descrito, por exemplo, que as células de CEB promovem a transdiferenciação dos fibroblastos residentes em miofibroblastos, mediada por TGF-  $\beta$ 1 (LEWIS et al, 2004; KELLERMAN et al., 2008) e IL- 1 $\beta$  (LYGOE et al, 2007).

Em adição, IL-1 $\alpha$ , VEGF (JUNG et al., 2009), TGF1 $\beta$  (DALY et al., 2010, COSTEA et al., 2013) estimulam a produção de CCL7 (JUNG et al., 2009), HGF, CXCL2/SDF1, pelos FACs (DALY et al., 2010), cujas ações refletem num maior potencial de migração e invasão

das células tumorais. A secreção de BDNF (DUDÁS et al., 2011) também contribui para uma maior expressão de marcadores epitélio-mesênquima pelas células tumorais e perda de adesão celular (CIRILLO et al., 2016). Fatores de crescimento, como HGF e ativina A, induzem, ainda, a proliferação das células malignas dos CEBs (LEWIS et al., 2004; DALY et al, 2008; KELLERMAMN et al., 2008; LIN et al., 2011; SOBRAL et. al, 2011b). A Figura 6 ilustra a interação parácrina entre células tumorais e FACs.



**Figura 6. Ativação dos Fibroblastos associados ao câncer em Carcinoma Escamocelular de Boca.** A ativação dos FACs em CEBs ocorre através da secreção de TGF- $\beta$ 1 e IL-1 $\beta$  pelas células tumorais, que transdiferenciam os fibroblastos residentes em FACs e estes passam a secretar fatores que contribuem para a progressão tumoral.

Os FACs apresentam também uma importante função na formação de um microambiente tumoral imunossupressor e no escape do tumor frente as defesas do sistema imunológico em CEBs. Isto ocorre devido a sua participação na modulação da função das células T efetoras durante as respostas imunes antitumorais, inibição da proliferação das células T, co-regulação de moléculas e citocinas imunossupressoras (destaca-se TGF- $\beta$  e VEGF), indução de apoptose das células T reguladoras (TAKAHASHI, 2015) e da expressão de macrófagos do fenótipo M2 (TAKAHASHI, 2017), uma maior microdensidade vascular (LIN et al., 2017), devido a produção de PGE2 via COX-2 (ALCOLEA et al., 2012), bem como, HGF, CXCL12/ SDF-1 e BMP4 (LEEF E THOMAS, 2013). Em adição, já está bem descrita a participação dos FACs na promoção de recorrência, metástase e baixa sobrevida dos pacientes com CEBs (KELLERMAN et al., 2007; LIN et al., 2017), através de mecanismos dependentes de MMP2 e MMP9 (SOBRAL et al 2011b) e secreção de hialuronato (COSTEA et al., 2013). Além disso, estas células influenciam a osteoclastogênese dependente de RANK-L, promovendo invasão óssea e conseqüente aumento da morbidade e pior prognóstico dos pacientes com esta doença (ELMUSRATI et al., 2017).

Conforme já descrito no item 1.2, resultados de nossa equipe demonstram que FACs podem ser fonte de ligantes HH no CEB, mas, não é de nosso conhecimento, trabalhos publicados na literatura que avaliam a relação entre via Hedgehog e FACs, em CEB.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O CEB é uma neoplasia localmente invasiva que frequentemente é diagnosticada em estágio clínico avançado e apresenta altas taxas de morbimortalidade. Deste modo, contribuir com estudos sobre a patogênese desta doença favorece a identificação de biomarcadores para diagnóstico, prognóstico, com vistas a terapias mais eficazes. Neste aspecto, a avaliação de cascatas de sinalização embrionárias em câncer é um campo de investigação crescente e a via Hedgehog tem se destacado neste contexto. A desregulação desta via, em CEBs, já foi demonstrada (CAVICCHIOLI BUIM et al., 2011) e pode estar associada a diversos mecanismos relacionados ao desenvolvimento dos CEBs, como a ativação do estroma tumoral. Neste compartimento, evidências recentes demonstram participação dos FACs na biologia tumoral por diversas formas, dentre estas, destaca-se mecanismos de remodelação da matriz extracelular pela secreção de MMPs afim de propiciar a invasão tumoral.

Nos últimos anos, alguns autores têm descrito a participação da via HH na manutenção do fenótipo FACs e, ainda, estas células podem produzir ligantes HH com ação parácrina, favorecendo mecanismos relacionados a progressão tumoral. Apesar destes avanços, não há na literatura nenhum trabalho que avalia componentes HH em FACs de CEBs. No entanto, resultados preliminares de estudos *in vitro* do nosso grupo, mostram que esta célula pode ser fonte de ligantes HH e contribuir, em conjunto com as células tumorais, para a tumorigênese através de diversos mecanismos, tal como a invasão tumoral.

## **3. HIPÓTESE**

Fibroblastos associados ao câncer representam uma fonte de ligantes HH e há uma relação destas células com moléculas Hedgehog e invasão tumoral (MMP14), em carcinoma escamocelular de boca.

## **4. OBJETIVOS**

#### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a população de fibroblastos associados ao câncer, a sua relação com moléculas Hedgehog (SHH, IHH e GLI1) e expressão de MMP14, em carcinoma escamocelular de boca.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a expressão das proteínas  $\alpha$ -SMA, S100A4 e FAP na população de células estromais de CEB;
- Identificar as proteínas SHH, IHH e GLI1 em fibroblastos associados ao CEBs;
- Avaliar a relação entre a expressão de moléculas Hedgehog (SHH, IHH e GLI1) em células malignas e fibroblastos associados ao CEB;
- Associar a relação entre os marcadores de fibroblastos ativados, moléculas Hedgehog e MMP14, em CEB.

### 5. MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O protocolo deste trabalho foi submetido ao comitê de ética em pesquisa com seres humanos do Instituto Gonçalo Moniz (IGM, Fiocruz, Bahia), o qual emitiu parecer favorável número 2.295.634.

#### 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO E CASUÍSTICA

Inicialmente, foi realizado o cálculo amostral através do Epi Info™ v.06 (*Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA*), com poder de 95% e considerando-se a frequência de CEBs no Estado da Bahia (8,0%; INCA), cujo resultado foi de 108 casos. No levantamento inicial nos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Centro de Diagnóstico Pires (Feira de Santana, Bahia), entre os períodos de 2010 a 2014, localizamos 128 casos com Diagnóstico de Carcinoma Escamocelular de Oral. Entretanto, após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão dos casos desta casuística, listados abaixo (Tabela 1), 70

casos de CEB foram utilizados neste estudo. Os dados clínicos referentes à idade, sexo, localização anatômica e tamanho da lesão foram obtidos a partir das fichas de exames anatomopatológicos. Para uma análise comparativa, foram analisadas as mucosas adjacentes (MAT) livres de tumor (n=10).

Tabela 1. Critérios utilizados para a inclusão e exclusão da casuística

<b>Critérios de Inclusão</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diagnóstico de carcinoma escamocelular</li> <li>• Localização: dois terços anteriores da língua, assoalho bucal, palato duro, mucosa jugal, região retromolar e gengiva</li> <li>• Presença do componente estromal e ilhas de células tumorais suficientes para a gradação histológica e obtenção de pelo menos 3 campos microscópicos, em aumento final 200x</li> </ul>
<b>Critérios de Exclusão</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Localização: lábio, terço posterior e base de língua, palato mole, valécula epiglótica e garganta</li> <li>• Ausência de preservação do tecido</li> <li>• Blocos de parafina com material exíguo</li> <li>• Material pouco representativo do tumor</li> </ul>

### 5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a revisão e análise morfológica dos casos de CEB, cortes de 4µm de espessura foram obtidos dos blocos de parafina e submetidos à coloração pela hematoxilina/eosina, conforme a rotina do Serviço de Histotecnologia do IGM. O diagnóstico e gradação histológica dos CEBs foram checadas por um patologista, considerando os parâmetros definidos pela Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017).

### 5.4 TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Após a padronização para determinar as melhores condições para cada anticorpo, as secções histológicas de 4µm de espessura foram submetidas à técnica imuno-histoquímica para marcação dos anticorpos  $\alpha$ -SMA, S100A4, FAP, SHH, IHH, GLI1 e MMP14 (MT-MMP1). Inicialmente, seguiram para desparafinização em xilol, imersão em álcool etílico e re-hidratação com água corrente. Para exposição dos epítomos antigênicos, as secções foram submetidas à recuperação antigênica, em calor úmido por 40 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena (PeroxidaseBlockingSolution<sup>TM</sup>Dako, Carpinteria, USA) foi realizado protegido da luz, por 10 minutos e o bloqueio das proteínas teciduais realizado com leite

desnatado a 10% por 30 minutos. Os anticorpos primários foram incubados por 1 hora ( $\alpha$ -SMA), em temperatura ambiente ou overnight, 18h (demais anticorpos) à temperatura de 4°C. Dados sobre fabricante e clone dos anticorpos estão descritos na Tabela 2.

Após a incubação do anticorpo primário, os reagentes HRP Link e HRP Enzyme (Advance™, Dako Corporation, Carpinteria, USA) foram aplicados nos cortes histológicos, 20 minutos cada. As reações foram reveladas com 3,3-diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, USA), por 5 minutos, em câmara escura e, posteriormente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto e montadas com bálsamo do Canadá natural. Para o controle negativo das reações, cada anticorpo primário foi substituído por soro normal de mesmo isotipo. Os controles positivos foram: placenta (SHH, IHH e GLI-1), Câncer de Mama (S100A4, FAP e MMP14) e, para o  $\alpha$ -SMA, vasos sanguíneos serviram como controle interno.

A co-localização das proteínas relacionadas à fibroblastos (S100A4,  $\alpha$ -SMA) com os ligantes da via HH (SHH) e MMP14 em CEBs foi identificada utilizando o kit EnVision™ G2 Doublestain System e o sistema polimérico de amplificação Advance™ (Dako, Carpinteria, USA), com os cromógenos RedPermanent e Vina Green.

Tabela 2. Dados do fabricante e clone.

<b>Anticorpo</b>	<b>Marca comercial</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Recuperação</b>
<b>SHH</b>	Novus Biologicals	5H4	1:1000	Citrato pH 6,0
<b>IHH</b>	Novus Biologicals	EP1192Y	1:500	Citrato pH 6,0
<b>GLI 1</b>	Novus Biologicals	Policlonal	1:600	Citrato pH 6,0
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	DAKO	1A4	1:200	Citrato pH 6,0
<b>FAP</b>	Invitrogen	Policlonal	1:50	Citrato pH 9,0
<b>S100A4</b>	DAKO	Policlonal	1:1000	Citrato pH 6,0
<b>MMP14</b>	Novus Biologicals	EP1264Y	1:250	Citrato pH 6,0

## 5.5 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

As lâminas foram escaneadas em microscópio digital virtual *Aperio* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*) e exibidas em um monitor, com auxílio do programa *AperioImageScope* (*Leica Microsystems, Wetzlar, Germany*). Um patologista (examinador 1) selecionou um mínimo de três e máximo de cinco áreas representativas dos tumores e, em cada uma destas, considerou-se uma proporção mínima de 50% de estroma. Cabe ressaltar que estas áreas supracitadas foram escolhidas para um único marcador ( $\alpha$ -SMA). Em seguida, um segundo examinador selecionou estas mesmas para os marcadores: SHH, IHH, GLI1, S100A4, FAP e MMP14.

A avaliação das imunomarcações foi realizada por um patologista oral (examinador 3), apenas nas áreas previamente selecionadas pelos examinadores 1 e 2. Levou-se em consideração a localização das proteínas: membranar e/ou citoplasmática e citoplasmática e/ou nuclear (apenas para a proteína GLI1), nas células tumorais e/ou células morfológicamente identificadas como fibroblastos (FAC). Para cada um dos compartimentos (parênquima e estroma) foi dado um escore imuno-histoquímico, como segue: escore negativo (-), <5% de células imunomarcadas; escore 1+, 5-25%; escore 2+, 26-50% e escore 3+ >51% de células imunopositivas. Nas margens livres de tumor, adotou-se os mesmos critérios semi-quantitativos, em epitélio e lâmina própria.

Em adição, as proteínas  $\alpha$ -SMA/SHH,  $\alpha$ -SMA/IHH,  $\alpha$ -SMA/MMP14, S100A4/SHH, S100A4/MMP14 foram avaliadas através de dupla marcação. A co-localização foi considerada positiva, nas seguintes situações: a) quando os cromógenos vermelho e verde foram sobrepostos, resultando em coloração arroxeadada; b) quando as cores vermelho e verde estavam individualizadas, porém em uma mesma célula.

## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram organizados em planilhas dos programas *GraphPad Prism* versão 6.03 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*) e *SPSS* versão 17.0 (*SPSS, Inc, Chicago, IL, USA*). Os dados categóricos analisados através dos seguintes testes, Qui-quadrado e correlação de  $\phi$  (Phi) para avaliar associação e correlação entre os marcadores. Os coeficientes de  $\phi$  variam de -1 a +1, sendo que estes valores representam uma correlação perfeita negativa ou positiva, respectivamente. Neste aspecto, a tabela 3 demonstra interpretação para os valores de coeficientes de  $\phi$ . A análise estatística deste estudo

considerou como nível de significância o valor de “p” correspondente a alfa ( $\alpha$ ) menor ou igual a 5%.

Tabela 3. Interpretação para valores de Coeficiente de  $\phi$  (Phi)

0,70 ou +	Associação positiva muito forte
0,50 – 0,69	Associação positiva forte
0,30 – 0,49	Associação moderadamente positiva
0,10 -0,29	Fraca associação positiva
0,1 – 0,09	Associação positiva indiferente
0,00	Sem associação
-0,1 – -0,09	Associação negativa indiferente
-0,10 – -0,29	Fraca associação negativa
-0,30 – -0,49	Associação moderadamente negativa
-0,50 – -0,69	Associação negativa forte
-0,70 ou -	Associação negativa muito forte

Fonte: Adaptado de James A Davis. Elementary Survey Analysis. Englewood Cliffs, NJ.: Prentice-Hall, 1971, p. 49.

## 6. RESULTADOS

A amostra deste estudo foi composta por 70 casos de CEBs, sendo que 49 lesões (70%) acometeram homens e 21 (30%) mulheres. A idade dos pacientes variou de 31 a 85 anos, com média de 61,5 (DP $\pm$ 11,8). A língua (n=43; 61,42%) foi a localização mais frequente, seguida pelo assoalho de boca (n=14; 20%), palato duro (n=7; 10%), mucosa jugal (n=4; 5,72%), gengiva (n=1; 1,43%) e região retromolar (n=1; 1,43%). De acordo com a classificação da OMS (2017), 18 CEBs (25,72%) foram classificados como bem diferenciados, 45 (64,28%) moderadamente diferenciados e 7 (10%) CEBs, como pouco diferenciado. Os dados estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4. Características clínicas e gradação histológica de 70 pacientes com CEB

Parâmetros clínicos	Total (n)	%
<u>Sexo</u>		
Masculino	49	70
Feminino	21	30
<u>Localização</u>		
Língua	43	61,42
Assoalho de boca	14	20
Palato duro	7	10
Mucosa jugal	4	5,72

Região retromolar	1	1,43
Gengiva	1	1,43
<b>Gradação histológica</b>		
Bem diferenciado	18	25,72
Moderadamente diferenciado	45	64,28
Pouco diferenciado	7	10

## 6.1 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DA POPULAÇÃO DE FIBROBLASTOS

### 6.1.1 $\alpha$ -SMA

A proteína  $\alpha$ -SMA foi identificada exclusivamente em membrana e citoplasma de células do estroma. Em especial, localizada adjacente as ilhas tumorais, com predomínio em células morfológicamente semelhantes a fibroblastos. Quarenta e cinco CEBs (64,28%) foram positivos para a proteína  $\alpha$ -SMA, sendo o escore 3+ predominante (n=24; 53,33%), seguido do escore 1+ (n=13; 28,89%) e 2+ (n=8; 17,78%) (Tabela 5). Nas MAT (n=10), a proteína  $\alpha$ -SMA foi negativa (p= 0,010). Não foi observada relação estatisticamente significativa, entre os níveis de imunexpressão deste marcador com os diferentes graus histológicos (ANEXO A).

A figura 7 mostra a imunomarcção de  $\alpha$ -SMA em CEB (Figura 7-A, D e G) e as comparações entre os grupos de CEB e MAT estão representadas na figura 8.

### 6.1.2 S100A4

A proteína S100A4 foi identificada predominantemente na membrana e citoplasma de FACs. No entanto, outras células estromais também foram positivas, como células endoteliais e células inflamatórias. Para o estroma, 94,28% dos casos (n=66) foram positivos com maior prevalência do escore 3+ (n=41; 62,13%) seguido dos escores 2+ (n=17; 25,75%) e 1+ (n=8; 12,12%). Considerando-se o compartimento de células tumorais, 72,85% dos casos (n=51) foram positivos, com predomínio do escore 1+ (n=34; 66,67%) seguido dos escores 2+ (n=13; 25,49%); 3+ (n= 4; 7,84) (Tabela 5). Nas MATs, a marcação no epitélio estava restrita a células de aparência dendrítica e, em lâmina própria, 90% (n=9) das amostras foram positivas para esta proteína, com predomínio do escore 3+ (n=4; 44,44%;), seguido dos escores 1+

(n=3; 33,34%) e 2+ (n=2; 22,22%), em um padrão semelhante ao estroma tumoral ( $p=0,1448$ ). A distribuição da imunomarcção de S100A4 entre os graus histológicos de malignidade dos CEBs também foi semelhante (ANEXO A).

A figura 7 mostra a imunomarcção de S100A4 em CEB (Figura 7-B, E e H) e MAT (Figura 7-L). As comparações entre os grupos de CEB e MAT estão representadas na figura 8.

### 6.1.3 FAP

A proteína FAP foi identificada predominantemente em membrana e citoplasma de células tumorais e, de forma focal, em FACs imediatamente adjacentes as ilhas tumorais. Considerando-se o compartimento de células tumorais, treze casos (18,57%) foram positivos, sendo o escore 1+ (n=6, 46,16%) predominante, seguido do 2+ (n= 5; 38,46) e 3+ (n=2; 15,38%). Em estroma, positividade foi detectada em 10 casos (14,28%), com os escores 1+ (n=8; 80%) e 2+ (n=2; 20%) (Tabela 5). Todas as margens tumorais foram negativas e não houve diferença de imunomarcção entre os CEBs e MAT ( $p=0,2287$ ) e nos diferentes tipos histológicos tumorais (ANEXO A).

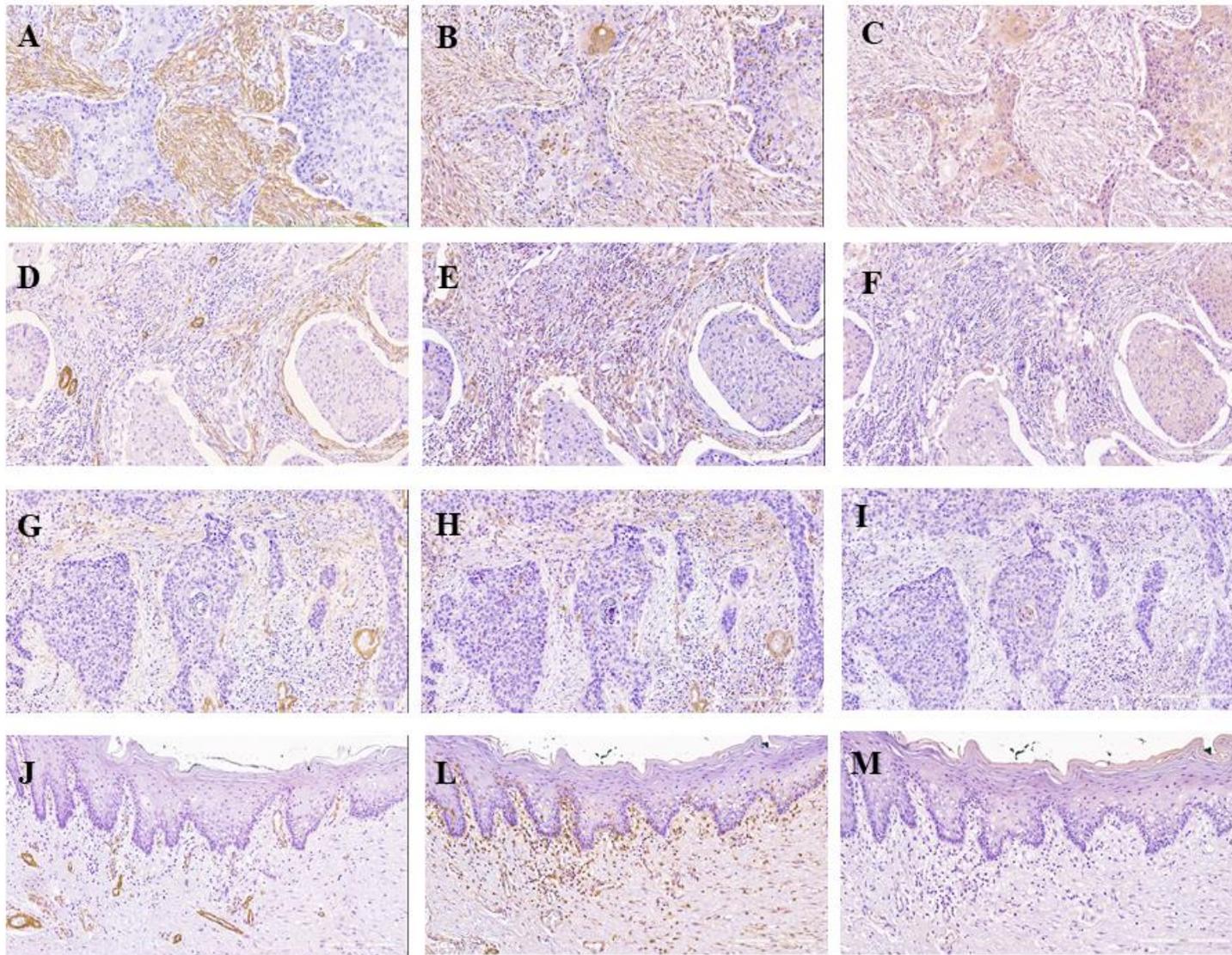
A figura 7 mostra a imunomarcção de FAP em CEB (Figura 7-B, E e H) e as comparações entre os grupos de CEB e MAT estão representadas na figura 8.

## 6.2 ASSOCIAÇÃO ENTRES OS MARCADORES DE FACS

Enquanto o marcador  $\alpha$ -SMA estava restrito ao estroma tumoral, S100A4 foi observada predominantemente no estroma, mas também no compartimento de células tumorais (Tabela 5,  $p<0,0001$ ) e a imunomarcção para FAP foi escassa, independente do compartimento tumoral (Tabela 5,  $p=0,16$ ). Considerando-se a positividade apenas em estroma, observou-se uma correlação positiva entre os níveis de  $\alpha$ -SMA/S100A4 ( $p< 0,0001$ ,  $\phi= 0,24$ ) e  $\alpha$ -SMA/FAP ( $p<0,0001$ ,  $\phi= 0,55$ ), enquanto que maiores níveis de S100A4 e FAP estão inversamente correlacionados ( $p<0,0001$  e  $\phi= -0,62$ ).

Tabela 5. Escores semi-quantitativos dos marcadores de fibroblastos em CEBs

Escore	<b><math>\alpha</math>-SMA</b>			<b>S100A4</b>			<b>FAP</b>		
	Parênquima n (%)	Estroma n (%)	p	Parênquima n (%)	Estroma n (%)	p	Parênquima n (%)	Estroma n (%)	p
0	70 (100)	25 (35,72)	<0,0001	19 (27,14)	4 (5,72)	<0,0001	57 (81,43)	60 (85,71)	0,16
1+	0 (0)	13 (18,58)		34 (48,58)	8 (11,42)		6 (8,57)	8 (11,43)	
2+	0 (0)	8 (11,42)		13 (18,58)	17 (24,28)		5 (7,14)	2 (2,86)	
3+	0 (0)	24 (34,28)		4 (5,7)	41 (58,58)		2 (2,86)	0(0)	
Total		70			70			70	



**Figura 7.**

**Imunoexpressão das proteínas  $\alpha$ -SMA, S100A4 e FAP em CEBs e MATs.** (A)  $\alpha$ -SMA: Escore 3+ em FACs de CEB. (B) S100A4: Escore 3+ em estroma e escore 1+ em células malignas. (C) FAP: Escore 3+ em células tumorais e 2+ em FACs. (D)  $\alpha$ -SMA: Escore 2+ em FACs de CEB. (E) S100A4: Escore 2+ em estroma (F) FAP: Escore 2+ em células tumorais e 1+ em células do estroma. (G)  $\alpha$ -SMA: Escore 1+, em FACs de CEB. (H) S100A4: Escore 1+ em estroma de CEBs. (I) FAP: Escore 0 em estroma e células tumorais de CEBs. (J) MAT negativa para  $\alpha$ -SMA (L) S100A4: Escore 3+ em MAT. (M) MAT negativa para FAP.

## 6.3 CARACTERIZAÇÃO DE COMPONENTES HEDGEHOG

### 6.3.1 SHH

A proteína SHH foi identificada predominantemente no citoplasma de células neoplásicas. Sessenta e quatro (91,43%) CEBs foram positivos, com predomínio do escore 3+ (n=50; 78,13%), seguido dos escore 1+ (n=8; 12,50%) e 2+ (n=6; 9,37%). Este padrão de imunomarcção para a proteína SHH foi semelhante nos diferentes graus de diferenciação histológica (ANEXO A). Quando presente no estroma tumoral (n=39; 55,72%), a imunomarcção de SHH foi observada no citoplasma dos FACs, sendo o escore 1+ (n=23; 58,98%) predominante, seguido do escore 2+ (n=8; 20,51%), 3+ (n=8; 20,51%) (Tabela 6). Células inflamatórias e endoteliais também foram positivas para este marcador. Nas MATs, 6 casos (60%) foram positivos para SHH, no epitélio, com maior prevalência do escore 3+ (n=3; 50%), e seguido dos escores 2+ (n=2; 33,33%) e 1+ (n=1; 16,67%) e observou-se uma diferença estatisticamente significativa quando comparado aos CEBs (p=0,0052).

A figura 9 mostra a imunomarcção de SHH em CEB (Figura 9-A) e MAT (Figura 9-D). As comparações entre os grupos de CEB e MAT estão representadas na figura 8.

### 6.3.2 IHH

A proteína IHH foi identificada predominantemente no citoplasma de FACs. Trinta e três (47,14%) dos casos foram positivos para a proteína IHH, com predominância do escore 1+ (n=18; 54,54%), seguido dos escores 3+ (n=9; 27,28%) e 2+ (n=6; 18,18%). No compartimento das células tumorais, foi observada positividade em 40% dos casos (n=28) com maior prevalência do escore 2+ (n=10; 35,72%) e 3+ (n=10; 35,72%), seguido do escore 1+ (n=8; 28,58%) (Tabela 6). Células endoteliais e inflamatórias também exibiram imunomarcção para esta proteína. Evidenciou-se uma maior marcação desta proteína nos tumores bem diferenciados, quando comparados aos pouco diferenciados (p=0,0138) (ANEXO A). Todas as MATs (100%) foram negativas para a proteína IHH (p=0,0252).

A figura 9 mostra a imunomarcção de IHH em CEB (Figura 9-B) e as comparações entre os grupos de CEB e MAT estão representadas na figura 8.

### 6.3.3 GLI1

A proteína GLI1 foi identificada em células tumorais de CEBs em cinquenta e cinco (78,57%) casos de CEB. Com marcação predominantemente citoplasmática (n=37; 67,28%), mas também citoplasmática e nuclear (n=18; 32,72%). Considerando estes dois padrões de marcação, observou-se maior prevalência do escore 3+ (n=28; 50,91%) seguido do escore 1+ (n=15; 27,28%) e 2+ (n=12 21,81%) que se comportou de forma similar em todos os graus histológicos (ANEXO A). No estroma dos CEBs, esta proteína foi observada predominantemente no citoplasma de fibroblastos em 31 casos (44,29%), com predomínio do escore 1+ (n=23; 74,20), seguido dos escores 2+ (n=7; 22,58%) e 3+ (n=1; 3,22%). Raras células morfológicamente semelhantes a fibroblastos apresentavam GLI1 nuclear, enquanto que a presença desta proteína, em núcleo, foi um achado frequente em células endoteliais (Tabela 6). Nas MATs, em epitélio, 4 (40%) amostras foram positivas para a proteína GLI1, com marcação apenas citoplasmática (n=3; 75%) e citoplasmática e nuclear (n=1; 25%), com predomínio do escore 3+ (n=2; 66,67%) seguido do escore 1+ (n=1; 33,33%). Já na lâmina própria, 1 caso (10%) foi positivo, apresentando o escore 3+. CEBs exibiram uma maior imunomarcação para GLI1 (p=0,0350).

A figura 9 mostra a imunomarcação de GLI1 em CEB (Figura 9-C) e MAT (Figura 9-F). As comparações entre os grupos de CEB e MAT estão representadas na figura 8.

Tabela 6. Escores semi-quantitativos dos componentes da via HH em CEBs.

Escore	SHH			IHH			GLI1		
	Parênquima n (%)	Estroma n (%)	p (valor)	Parênquima n (%)	Estroma n (%)	p (valor)	Parênquima n (%)	Estroma n (%)	p (valor)
0	6 (8,57)	31 (44,28)	<0,0001	42 (60)	37 (52,86)	p=0,15	15 (21,42)	39 (55,71)	p<0,0001
1+	8 (11,43)	23 (32,86)		8 (11,43)	18 (25,72)		15 (21,42)	23 (32,86)	
2+	6 (8,57)	8 (11,43)		10 (14,28)	6 (8,57)		12 (17,16)	7 (10)	
3+	50 (71,43)	8 (11,43)		10 (14,28)	9(12,85)		28 (40)	1 (1,43)	
Total	70			70			70		

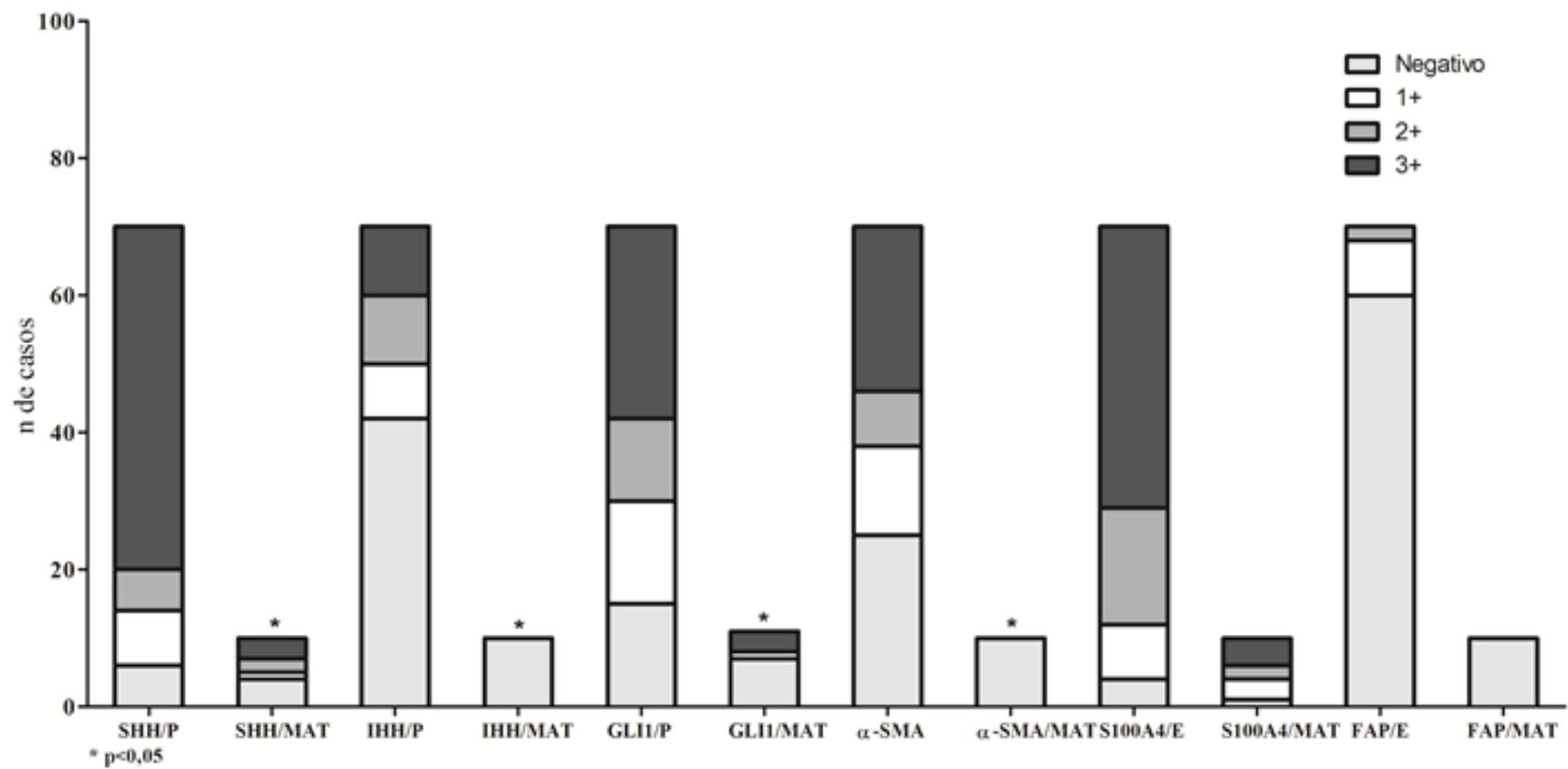
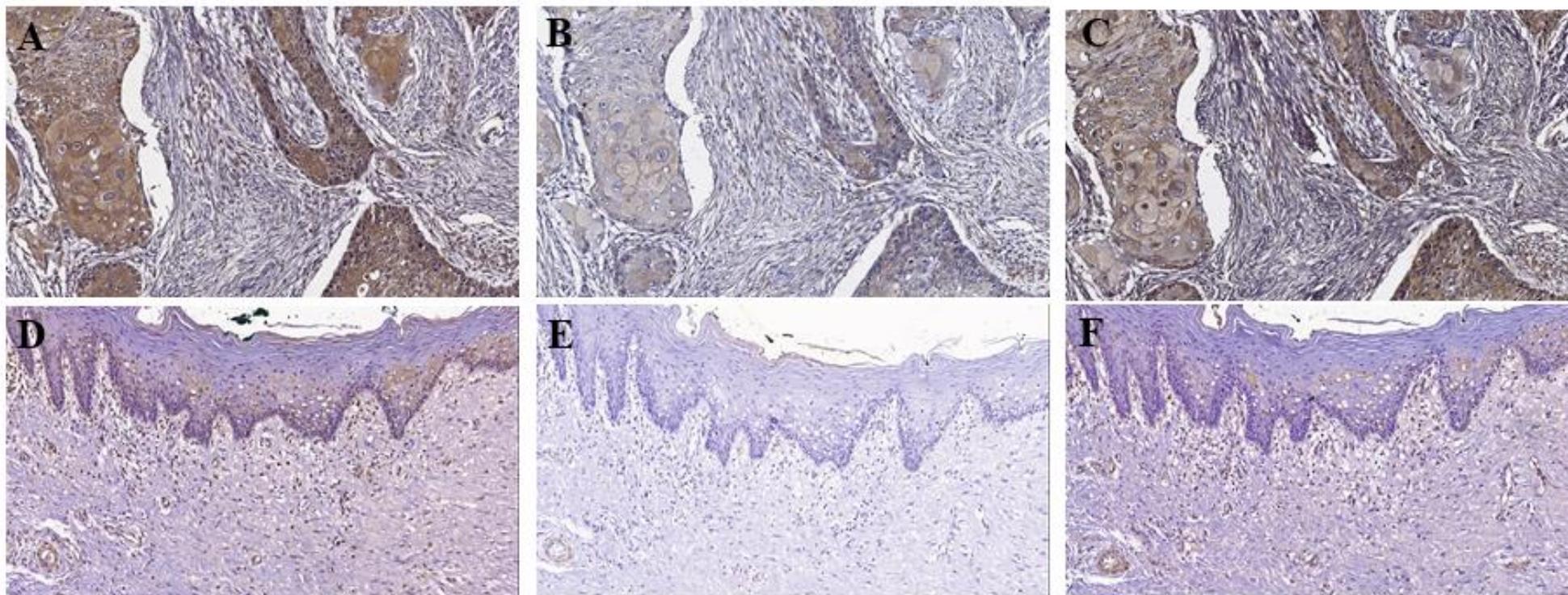


Figura 8. Associação dos marcadores  $\alpha$ -SMA, S100A4, FAP, SHH, IHH e GLI1 em CEBs e MATs



**Figura 9. Imunoexpressão de SHH, IHH e GLI 1 em CEBs e MATs.** (A) SHH: Escore 3+ em células malignas de CEB. (B) IHH: Escore 2+ em células tumorais e escore 1+ para estroma (C) GLI: Escore 3+ para parênquima e escore 2+ para estroma. (D) SHH: Escore 1+ em MAT (E) MAT negativa para IHH (F) GLI1: 1+ em citoplasma e negativo em núcleo de células epiteliais de MAT.

#### 6.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE LIGANTES HH (CÉLULAS TUMORAIS) e FACs

Conforme destacado em "Material e Métodos", as análises dos ligantes HH (SHH e IHH) e marcadores de FACs foram realizadas nas mesmas áreas tumorais, o que permitiu melhor compreender a associação entre as moléculas HH imunolocalizadas em células tumorais e a população de FACs  $\alpha$ -SMA, S100A4 e FAP positivos. Considerando-se os critérios semi-quantitativos adotados, houve correlação positiva entre a imunoposição de SHH e IHH com  $\alpha$ -SMA ( $p < 0,0001$ ,  $\phi = 0,51$ ;  $p = 0,0094$ ,  $\phi = 0,60$ ) e SHH/S100A4 ( $p = 0,087$ ,  $\phi = 0,94$ ) e IHH com FAP ( $p = 0,0003$ ,  $\phi = 0,98$ ). Correlação negativa foi observada entre SHH/FAP ( $p < 0,0001$ ,  $\phi = -0,42$ ) e IHH/S100A4 ( $p < 0,0001$ ;  $\phi = -0,51$ ). As correlações positivas estão representadas na Figura 10.

Para avaliar se a imunoposição de SHH em estroma estava relacionada aos FACs, foi realizada dupla marcação imunohistoquímica para as proteínas SHH/ $\alpha$ -SMA, SHH/S100A4. Pode-se perceber a presença de SHH no citoplasma das FACs  $\alpha$ -SMA positivo (Figura 11, A-C), e em menor proporção, no citoplasma de FACs S100A4+ (Figura 11, D-F).

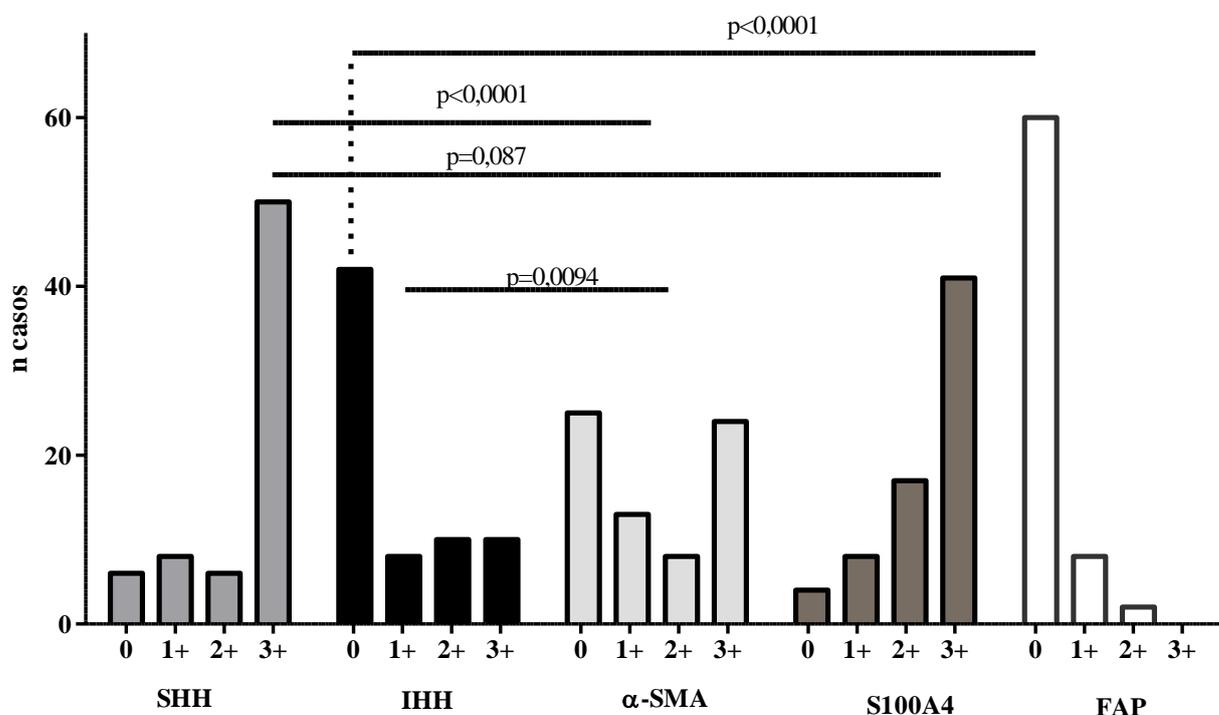
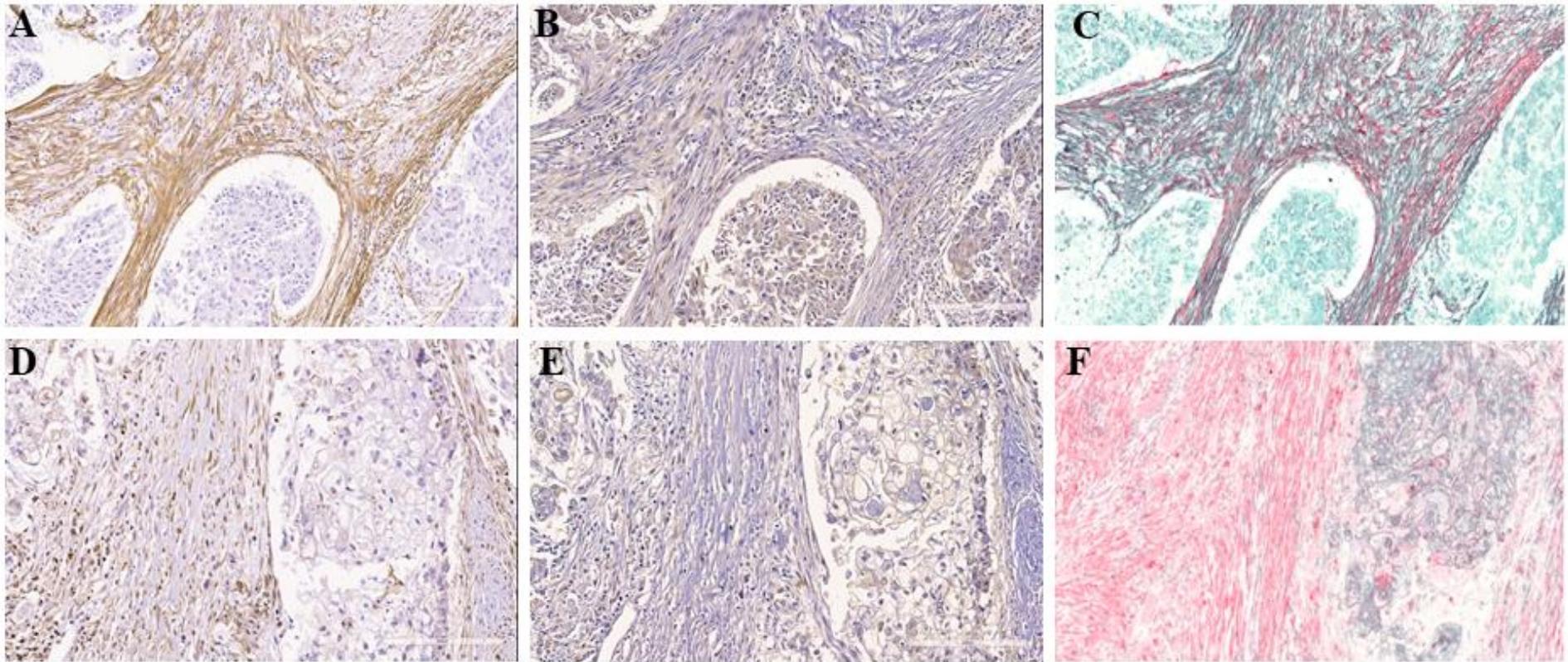


Figura 10. Imunoexpressão dos ligantes HH e marcadores para FACs em CEBs



**Figura 11. Co-localização das proteínas  $\alpha$ -SMA/SHH e S100A4/SHH em CEB.** (A) Imunoexpressão de  $\alpha$ -SMA em FACs de CEBs. (B) Imunoexpressão de SHH em células malignas e em FACs de CEBs. (C) Dupla marcação de  $\alpha$ -SMA (em vermelho) no estroma e SHH (em verde) no parênquima e FACs com co-localização das proteínas  $\alpha$ -SMA e SHH (em roxo) no estroma tumoral. (D) Imunoexpressão de S100A4 em estroma tumoral. (E) Imunoexpressão de SHH em parênquima e estroma de CEBs (F) Dupla marcação de S100A4 no estroma (Red permanent) e SHH no parênquima (Vina Green). Co-localização de S100A4 e SHH (roxo) em células tumorais de CEBs.

## 6.5 ASSOCIAÇÃO COM INVASÃO TUMORAL

### 6.5.1 MMP14

A proteína MMP14 foi identificada predominantemente em membrana e citoplasma de células das ilhas tumorais ( $p < 0,0001$ , Tabela 6), especialmente na periferia destas, com predomínio em células morfológicamente semelhantes a fibroblastos. Cinquenta e cinco casos (78,57%) de CEB foram positivos para esta proteína sendo o escore 3+ ( $n=31$ ; 56,36%) mais prevalente, seguido do escore, 1+ ( $n=13$ ; 23,64%) e 2+ ( $n=11$ ; 20%). Quando presente no estroma tumoral ( $n=42$ ; 60%), a imunomarcação de MMP14 foi identificada em células semelhantes a fibroblastos e observou-se o predomínio do escore 1+ ( $n=28$ ; 66,66%), seguido dos escores 2+ ( $n=10$ ; 23,80%) e 3+ ( $n=4$ ; 79,52). Todas as MAT ( $n=10$ ), apresentaram escore 0 para proteína MMP14.

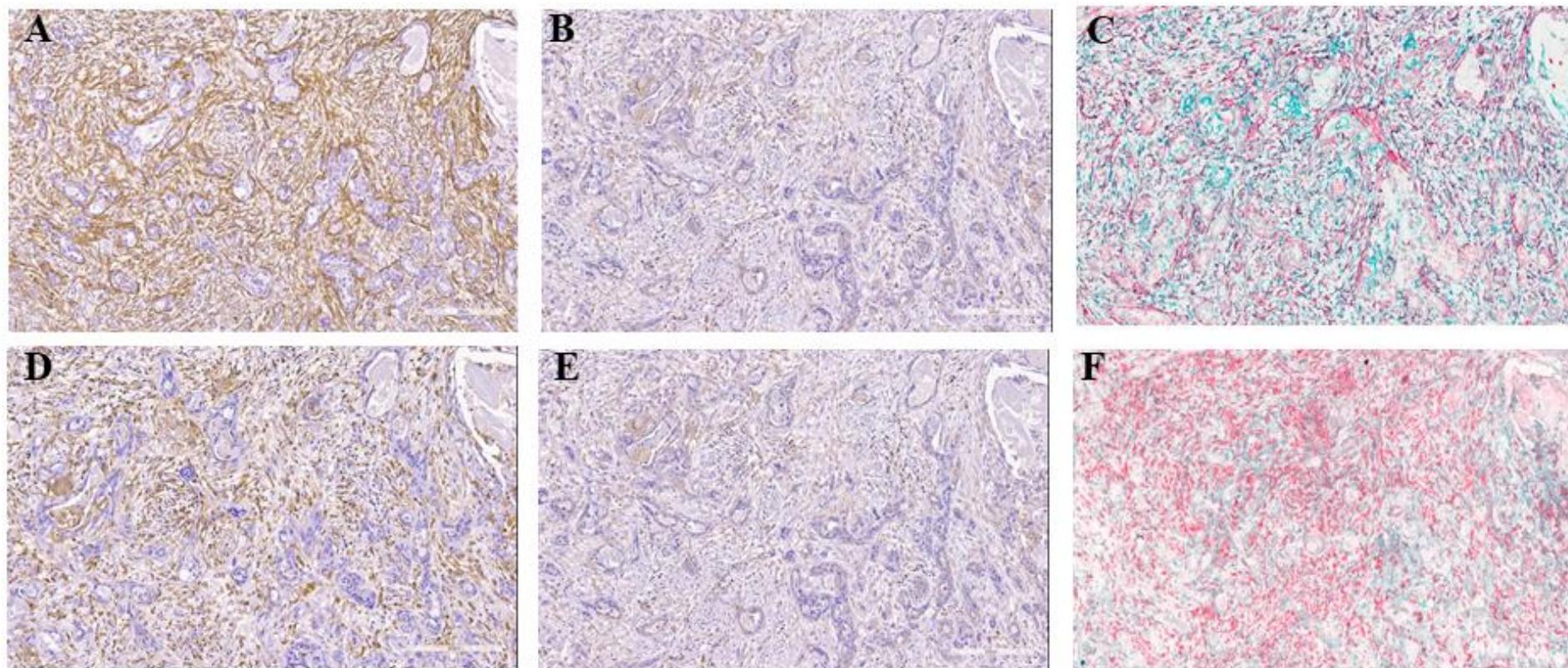
Tabela 7. Escores semi-quantitativos da proteína MMP14 em CEBs.

MMP14			
Escores	Parênquima	Estroma	p (valor)
0	15 (21,44)	28 (40)	<0,0001
1+	13 (18,57)	28 (40)	
2+	11 (15,71)	10 (14,29)	
3+	31 (44,28)	4 (5,71)	
Total	70		

## 6.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE MARCADORES MMP14, HH, $\alpha$ -SMA, S100A4 e FAP

Houve uma relação positiva entre moléculas SHH ( $p=0,019$ ,  $\phi=0,98$ ) e GLI1 ( $p=0,95$ ,  $\phi=0,99$ ) com MMP14, o que não foi observado para o IHH/MMP14 ( $p < 0,0001$ ,  $\phi=-0,15$ ). Um maior acúmulo de fibroblastos  $\alpha$ -SMA, S100A4 foi observado nas proximidades das ilhas tumorais, cujas células malignas também exibiam maior imunopositividade para MMP14 ( $p=0,27$ ,  $\phi=0,66$ ;  $p=0,016$ ,  $\phi=0,87$ ), o que não foi detectado em relação a FAP ( $p < 0,001$ ,  $\phi=-0,25$ ).

Para avaliar se a imunexpressão de MMP14 estava relacionada a população de FACs, foi realizada dupla marcação para as proteínas MMP14/ $\alpha$ -SMA e MMP14/S100A4. Pode-se perceber a presença de MMP14 no citoplasma de FACs  $\alpha$ -SMA positivo adjacentes as ilhas tumorais (Figura 12, A-C), o que não foi observado em FACs S100A4+ (Figura 12, D-F



**Figura 12. Co-localização das proteínas  $\alpha$ -SMA/MMP14 e S100A4/MMP14 em CEBs.** (A) Imunoexpressão de  $\alpha$ -SMA em FACs de CEBs (B) Imunoexpressão de MMP14 em células malignas e em FACs adjacentes as ilhas tumorais de CEBs. (C) Dupla marcação de  $\alpha$ -SMA em vermelho no estroma (*red permant*) e MMP14 no parênquima (*Vina Green*) e FACs com co-localização das proteínas  $\alpha$ -SMA e SHH (em roxo) no estroma tumoral. (D) Imunoexpressão de S100A4 em estroma tumoral. (E) Imunoexpressão de MMP14 em células malignas e em FACs adjacentes as ilhas tumorais de CEBs. (F) Dupla marcação de S100A4 no estroma (Red permanent) e MMP14 no parênquima (Vina Green).

## 7. DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos a população de fibroblastos associados ao câncer em 70 casos de carcinomas escamocelulares orais, através da expressão imuno-histoquímica dos marcadores  $\alpha$ -SMA, S100A4 e FAP. Investigamos também a presença dos componentes da via HH (SHH, IHH e GLI1) em FACs e em células tumorais, a fim de melhor compreender a participação da desta via na ativação do estroma tumoral e os mecanismos de funcionamento desta cascata nos CEBs. Somado a isso, investigamos se FACS e moléculas HH estão correlacionados a imunomarcção da proteína MMP14, cuja expressão está associada a transição epitélio-mesênquima e invasão das células tumorais.

No presente estudo, indivíduos do sexo masculino foram os mais acometidos pelos CEBs e a média etária foi de 62,1 anos. Estes resultados corroboram com outros estudos que indicam que homens, entre a 5ª e a 6ª década de vida são o grupo de maior prevalência desta doença (FENG et al., 2016; LAWAL et al., 2017). Os sítios anatômicos mais acometidos, língua e assoalho de boca, também foram os locais comumente descritos em outros estudos (FRONIE et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014). Quanto a gradação histológica, tumores moderadamente diferenciados representaram o grau mais prevalente, o que diverge de alguns trabalhos recentes que descrevem tumores bem diferenciados como os mais frequentes (DOURADO et al., 2017; LAWAL et al., 2017).

Considerando-se que "*Tumores são feridas que nunca cicatrizam*" (DVORAK, 1986; 2015), o papel dos fibroblastos ativados nesta doença tem se destacado nas últimas décadas, inclusive com a evidência da participação de fibroblastos  $\alpha$ -SMA positivos na progressão dos CEBs (BARTH et al., 2004; KELLERMAN et al., 2007, SOBRAL et al., 2011, ALCOLEA et al., 2012, LIN et al., 2017). No presente estudo, a expressão de  $\alpha$ -SMA foi exclusiva no estroma tumoral, em fibroblastos e, como já esperado, em vasos sanguíneos. Esta proteína destaca-se na identificação da população de fibroblastos ativados em diversos tipos tumorais (BARTH et al., 2004; KELLERMAN et al., 2007; TOGO et al., 2013), como tumores de mama (ORIMO et al., 2005), próstata (OLUMI et al., 1999), ovário (YANG et al., 2006), pâncreas (HWANG et al., 2008), pele (SNEDDON et al., 2006), cólon (DE WEVER et al., 2004) esôfago (ZHANG et al., 2009) e boca (LIU et al., 2006; SOBRAL et al., 2011a). A expressão de  $\alpha$ -SMA está associada a um fenótipo mais invasivo (KELLERMANN et al., 2008 e KELLERMANN et al., 2007) e há uma correlação entre esta população de células com

a densidade de macrófagos pró-tumorais (TAKAHASHI et al., 2017), os quais, por outro lado, também são fontes de ligantes da via HH (VALVERDE et al., 2016).

Além das células  $\alpha$ -SMA positivas, fibroblastos que expressam S100A4 também fazem parte da população de FACs no CEB, sinalizando que estes marcadores possam estar relacionados a origem distinta destas células. Conforme estudo de KIDD et al. (2012), por exemplo, em tumores experimentais de ovário e mama, FACS S100A4+ derivaram de células da medula óssea, enquanto os FACs  $\alpha$ -SMA+ tiveram origem de adipócitos. Ressalta-se ainda que, neste trabalho, observamos também imunomarcação de S100A4 em fibroblastos localizados na lâmina própria de mucosas adjacentes ao tumor, ao contrário de FACs  $\alpha$ -SMA+ que estavam exclusivamente em regiões de estroma tumoral.

Durante algum tempo, apenas a população de fibroblastos ativados esteve associada a capacidade de promover o crescimento tumoral (EREZ et al., 2010). Evidências mais recentes, entretanto, apontam que as células S100A4+ representam uma população de fibroblastos quiescentes, de comportamento indolente, epigeneticamente estáveis e precursores de fibroblastos ativados (KALLURI et al., 2016). Em adição, é bem descrita que esta molécula está expressa em células malignas que estão em processo de transição epitélio – mesênquima (VERED et al., 2010; ÖHLUND et al., 2014; GARSCARD e TLSTY 2016), o qual pode ser coordenado por FACs  $\alpha$ -SMA+, em carcinoma escamocelular oral (DING et al., 2014, ZHOU et al., 2014)

Um outro marcador que tem sido descrito em fibroblastos ativados é o FAP (ÖHLUND et al., 2014; GARSCARD e TLSTY 2016, MEZAWA et al, 2016), com resultados consistentes em tumores de mama (JIA et al., 2014), colo retal (KOCZOROWSKA et al., 2016) e estômago (WEN et al., 2017), por exemplo. Nas amostras estudadas, entretanto, a imunomarcação para FAP foi escassa, com resultados pouco expressivos tanto para as células tumorais quanto fibroblastos. Apesar de ZHOU et al. (2014) ter encontrado uma superexpressão do gene que codifica FAP em células de CEB, dados depositados no consórcio internacional "*The human protein atlas*" indicam que não há uma relação entre os níveis de transcrito e proteína, além de corroborar para a assertiva de que FAP não é um bom marcador de FACs, em CEBs, ao depositarem dados que demonstram uma baixa imunoeexpressão de FAP, nos tumores humanos avaliados.

Sendo assim, nossos resultados indicam que há uma heterogeneidade imunofenotípica na população de FACs de CEBs, refletindo, possivelmente, origens e funções distintas, conforme já observado em outros estudos (SUGIMOTO et. al, 2006; KIDD et al., 2012; COSTEA et al.,

2013, ISHII et al., 2015, DOURADO et al., 2016). No contexto do ambiente tumoral, FACs representam um importante tipo celular para a ativação estromal (SANTI et al., 2017) e *crosstalk* entre as células malignas e estromais (HANAHAN e COUSSENS, 2012).

Considerando-se este aspecto, moléculas HH tem se destacado em funções importantes para a iniciação e progressão de tumores (ÁRMAS-LOPEZ et al., 2017, WU et al., 2017). Se, por um lado, por muitos anos, o foco principal foi desvendar os mecanismos e participação das moléculas HH nas células malignas, atualmente, o estroma tem sido objeto de intensa investigação. A compreensão de que células estromais, como FACs, podem ser fonte de ligantes HH e, possivelmente, responsivos a esta via, ampliam as perspectivas dos estudos do nosso grupo de pesquisa que avaliam o potencial terapêutico e participação na patogênese desta cascata sinalizadora, em CEB (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011; DIAS et al., 2013; VALVERDE et al., 2016), já que estudos pré-clínicos em câncer de pâncreas, demonstraram que a inibição da via HH reduz a proliferação dos FACs e o tamanho do tumor (MPEKRIS et al., 2017),

A presença de SHH em FACs  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> e, em menor proporção, em fibroblastos S100A4<sup>+</sup>, indicam que estas células são fontes do ligante HH e podem participar da ativação desta via em células tumorais (WALTER et al., 2014; VALENTI et al., 2017) e outras células estromais (ABE e TANAKA, 2016), como células endoteliais (HARRIS et al., 2012, VALVERDE et al., 2016). Além disso, ligantes HH secretados por células tumorais aumentam a taxa de proliferação (BAILEY et al., 2008) e deposição de MEC (BAILEY et al., 2008; DOMENECH et al., 2012; VALENTI et al., 2017), com possível participação na ativação do perfil FAC  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> (BAILEY et al., 2008, AUGSTEN, 2014).

Apesar da densidade de FACs S100A4<sup>+</sup> ter sido mais frequente nos CEBs estudados, os nossos resultados indicaram que a imunexpressão do ligante SHH em células malignas parece estar mais associada a uma maior densidade de FACs  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> e, portanto, outros estudos devem ser conduzidos para avaliar se o SHH secretado pelas células malignas pode participar da ativação de fibroblastos estromais ou mediando a quimiotaxia, em um mecanismo similar ao descrito por DUNAEVA et al. (2010), para monócitos e SYN et al. (2009) para fibroblastos, em modelo de fibrose.

Uma limitação deste trabalho está relacionada a atividade e responsividade dos FACs a via HH, já que avaliamos apenas a imunopositividade para o fator de transcrição GLI1, sendo que o GLI2 é o principal fator de transcrição relacionado a atividade HH em células mesenquimais (LIANG et al., 2017). Destarte, alguns estudos atuais têm apontado que a

expressão de moléculas HH em FACs pode estar também relacionado a ativação de programas celulares que favorecem os mecanismos de reparo e consequente inibição da progressão tumoral, apesar destes estudos tratarem de um tipo específico de câncer de bexiga (LEE et al., 2014; SHIN et al., 2014).

A imensa maioria dos estudos que avaliam FACs, entretanto, descrevem o importante papel pró-tumoral destas células, incluindo o favorecimento da invasão das células de CEB, por favorecerem a TEM (JENSEN et al., 2015, CIRILLO et al., 2016) e degradação de proteínas da matriz extracelular mediada por MMP 2, 9 e 14 (ZHANG et al., 2006; SOBRAL et al., 2011). Sabendo-se que a proteína MMP14 é expressa em células que estão em TEM (TURUNEN et al., 2017) e que este evento é influenciado por FACs e moléculas HH (KATOH e KATOH, 2008, WANG et al., 2014; XU et al., 2014, STEINWAY et al., 2014), avaliamos se a imunexpressão desta molécula estava correlacionada com a densidade de FACs e moléculas HH. Observamos uma forte correlação positiva entre MMP14 em células tumorais, com FACs  $\alpha$ -SMA+, S100A4+, SHH e GLI1, sugerindo uma possível participação da via HH no processo de invasão tumoral mediado por MMP14, conforme já descrito para câncer de ovário (LIAO et al. 2009).

Resumidamente, a população de FACs é heterogênea em CEBs, sendo que as células  $\alpha$ -SMA+ contribuem como maior fonte do ligante SHH, apesar das células S100A4 contribuírem para a maior população de FACs, em CEBs. Os nossos resultados também corroboram para uma possível ativação HH parácrina (célula tumoral  $\rightarrow$  estromal), parácrina reversa (FACs  $\rightarrow$  Células Tumorais) e ativação estromal (FACs  $\rightarrow$  Células endoteliais) neste tumor. Em tempo, as moléculas HH, FACs SMA+ e S100A4 contribuem para um fenótipo invasor nas células tumorais.

## 8. CONCLUSÕES

- Em CEBs, há uma heterogeneidade imunofenotípica de FACs, sendo que a maior população é S100A4+, seguida de células positivas para  $\alpha$ -SMA. Por outro lado, a proteína FAP não é um bom marcador destas células, em CEBs.
- FACs são potenciais fonte de ligantes HH neste tumor e, dessa forma, podem mediar a ativação estromal e sinalização parácrina para as células tumorais e endoteliais, por exemplo. Em adição, FACs podem responder a via HH mediada por células malignas, através de GLI1 e, o aumento de densidade da FACs adjacentes a ilhas tumorais com maior imunexpressão de SHH e IHH corroboram para a função quimioatratora destas moléculas.
- Um aumento de moléculas HH e FACs está correlacionado a uma maior imunexpressão de MMP14, contribuindo para o fenótipo invasor, em CEBs.

## REFERÊNCIAS

- ABE Y.; TANAKA N. The Hedgehog signaling networks in lung cancer: the mechanisms and roles in tumor progression and implications for cancer therapy. **BioMed. Res. Int.**, v. 2016, p. 1:11, 2016.
- ADRIEN, J. et al. Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors. **Oral Oncol.**, v. 50, n. 2, p. 90–97, 2014.
- ALCOLEA, S. et al. et al. Interaction between head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE2. **J. Lipid Res.**, v. 53, p. 630–642, 2012.
- AMAKYE, D.; JAGANI, Z.; DORSCH, M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. **Nat. Med.**, v. 19, n. 11, p. 1410–1422, 2013.
- ARMAS-LÓPEZ, L. et al. The Hedgehog-GLI pathway in embryonic development and cancer: implications for pulmonary oncology therapy. **Oncotarget**, v. 8, n. 36, p. 60684–60703, 2017.
- AUGSTEN M. Cancer-associated fibroblasts as another polarized cell type of the tumor microenvironment. **Front Oncol.**, v. 4, p. 62, mar. 2014.
- BAGUL, N. et al. Dynamic role of myofibroblasts in oral lesions. **World J. Clin. Oncol.** v. 10, n. 6, p. 264-271, 2015.
- BAILEY, J. M. et al. Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 4, n. 19, p. 5995-6004, 2008.
- BARTH, P. J. et al. CD34+ fibrocytes, alpha-smooth muscle antigen-positive myofibroblasts, and CD117 expression in the stroma of invasive squamous cell carcinomas of the oral cavity, pharynx, and larynx. **Virch. Arch.**, v. 444, n. 3, p. 231-234, 2004.
- BELLONI, E. et al. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. **Nat. Genet.**, v. 14, p. 353-356, 1996.
- BERMUDEZ, O. et al. Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation. **PLoSOne.**, v. 8, n. 5, p.63226, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acesso em: 08 dez. 2017.
- CAVICCHIOLI BUIM M.E. et al. Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **Hum Pathol.**, v. 42, n. 10, p. 1484-1490, 2011.
- CHEN, F. et al. A novel prognostic index for oral squamous cell carcinoma patients with surgically treated. **Oncotarget.**, v. 8, n. 33, p. 55525-55533, 2017.

- CHENG, C.F. et al. Transforming growth factor alpha (TGFalpha)-stimulated secretion of HSP90alpha: using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGF beta-rich environment during wound healing. **Mol. Cell Biol.**, v. 28, p. 3344–3358, 2008.
- CHI A.C.; DAY, T.A.; NEVILLE, B.W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. **CA Cancer J. Clin.**, v. 65, p. 401-421, 2015
- CHOE, C. et al. Tumor-stromal interactions with direct cell contacts enhance motility of non-small cell lung cancer cells through the hedgehog signaling pathway. **Anticancer Res.**, v. 33, n. 9, p. 3715-3723, 2013.
- CIRILLO, N. et al. Cancer-associated fibroblasts regulate keratinocyte cell-cell adhesion via TGF- $\beta$ -dependent pathways in genotype-specific oral cancer. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 1, p. 76-85, 2017.
- COHEN, D. J. Targeting the hedgehog pathway: role in cancer and clinical implications of its inhibition. **Hematology/Oncol. Clinics North Am.**, v. 26, n. 3, p. 565–588, 2012.
- INCA. CONDUTAS DO INCA. Carcinoma Epidermóide da Cabeça e Pescoço. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.47, n. 4, p. 361-376, 2001.
- CORBIT, K.C. et al. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. **Nature**, v. 437, p. 1018–1021, 2005.
- COSTEA, D. E. et al. Identification of two distinct carcinoma-associated fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Res.**, v. 1, n. 13, p. 3888-3907, 2013.
- CRAWFORD, Y. et al. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. **Cancer Cell**, v. 15, p. 21–34, 2009.
- DALY, A.J.; MCILREAVEY, L.; IRWIN, C.R. Regulation of HGF and SDF-1 expression by oral fibroblasts – Implications for invasion of oral cancer. **Oral Oncol.**, v. 44, p. 646–651, 2008.
- DE PALMA, M.; BIZIATO, D.; PETROVA, T.V. Micro environmental regulation of tumour angiogenesis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 17, n. 8, p. 457-474, 2017.
- DE WEVER, O. et al. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. **FASEB J**, v. 18, p. 1016-1018, 2004.
- DIAS, R.B. et al. Enhanced expression of hedgehog pathway proteins in oral epithelial dysplasia. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 24, n. 8, p. 595-602, 2016.
- DING, L. et al.  $\alpha$ -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial-mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 43, n. 5, p. 335-343, 2014.

DOMENECH, M. et al. Hedgehog signaling in myofibroblasts directly promotes prostate tumor cell growth. **Integr Biol (Camb)**., v. 4, n. 2, p. 142-52, fev. 2012.

DOURADO, R. C. et al. Immunohistochemical Characterization of Cancer-associated Fibroblasts in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.** Set. 2017.

DUDÁS, J. et al. Tumor-produced, active Interleukin-1  $\beta$  regulates gene expression in carcinoma-associated fibroblasts. **Experimental Cell Research**., v. 317, n.15, p.2222-2229, 2011.

DUNAEVA, M. et al. Sonic hedgehog is a potent chemoattractant for human monocytes: diabetes mellitus inhibits Sonic hedgehog-induced monocyte chemotaxis. **Basic Res. Cardiol.** 2010 Jan;105, v.1, p. 61-71, jan, 2010.

DVORAK, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **N. Engl. J. Med.**, v. 15, n.26, p. 1650-9, dez. 1986.

DVORAK, H.F. Tumors: wounds that do not heal - Redux **Cancer Immunol. Res.**, v. 3, n. 1, p. 1-11, jan. 2015

E!-NAGGAR, A. K.et al. **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. 4th ed. IARC: Lyon, 2017.

ELMUSRATI, A.A. et al. Cancer-associated fibroblasts promote bone invasion in oral squamous cell carcinoma. **Br. J. Cancer**. v.117, n.6, p.861-875, set. 2017.

EREZ, N. et al. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kB-dependent manner. **Cancer Cell**, v. 17, p. 135–147, 2010.

KATOH, Y.; KATOH, M. Hedgehog signaling, epithelial to mesenchymal transition and miRNA (review). **Int. J. Mol. Med.**, v. 22: p.271-275, 2008.

KIDD ,S.; SPAETH, E.; WATSON, K. et al. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of the adipose derived and bone marrow-derived stroma. **PLoS One** n.7, p. 30563, 2012.

KOCZOROWSKA, M. M. et al. Fibroblast activation protein- $\alpha$ , a stromal cell surface protease, shapes key features of cancer associated fibroblasts through proteome and degradome alterations. **Mol. Oncol.**, v. 10, n.1, p. 40-58, 2016.

FARQUHAR, D.R. et al. Poor oral health affects survival in head and neck cancer. **Oral Oncol**. v. 73, p. 111-117, out. 2017.

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. **Med. Oncol.**, v. 31, n.7, p.41, jul. 2014.

FENG, Z. et al. Risk factors for patients with multiple synchronous primary cancers involving oral and oropharyngeal subsites. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 121, n. 4, p. 360-6, abr. 2016.

- FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 version 1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**; 2013. globocan.iarc.fr.
- FOULKES, W.D. et al. Cancer Surveillance in Gorlin Syndrome and Rhabdoid Tumor Predisposition Syndrome. **Clin. Cancer Res.**, v.23, n.12, p. 62-67, jun. 2017.
- FRONIE, A. F. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. **Rom J. Morphol. Embryol.**, v. 54, n. 2, p. 343–348, 2013.
- GABBIANI, G.; RYAN, G. B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia**, v. 27, n. 5, p. 549-550, mai. 1971.
- GASCARD, P.; TLSTY T.D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. **Genes Dev.**, v. 30, n.9. p. 1002-19, mai., 2016.
- GIANNONI, E. et al. Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial– mesenchymal transition and cancer stemness. **Cancer Res.**, v. 70, n. 17, p. 6945–6956, 2010.
- GLENTIS A. et al. Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane. **Nature Commun.**, v. 8, p. 924, 2017
- GÖRITZ, C. et al. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. **Science**, v. 333, n. 6039, p.238-242, jul. 2011.
- GORLIN, R.J.; GOLTZ R.W. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v. 262, p. 908–12, 1960.
- GURGEL, C.A. et al. Expression of Ki-67, p53 and p63 proteins in keratocyst odontogenic tumours: an immunohistochemical study. **J. Mol. Histol.**, v.39, n. 3, p. 311-316, jun. 2008.
- HAHN, H. et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Cell**, v.85, p.841–851, 1996.
- HANAHAN, D.; COUSSENS, LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell.**, v. 21, n. 3, p. 309-22, mar. 2012.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100 p. 57–70, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HARDCASTLE, Z. et al. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. **Development**, v. 125, n.15, p. 2803–2811, 1998.
- HARRIS, L.G. et al. Increased vascularity and spontaneous metastasis of breast cancer by hedgehog signaling mediated upregulation of *cyr61*. **Oncogene.**, v. 31, n. 28, p.3370-80, jul. 2012.

- HASSOUNAH, N. B.; BUNCH, T. A.; MCDERMOTT, K. M. Molecular pathways: the role of primary cilia in cancer progression and therapeutics with a focus on hedgehog signaling. **Clin. Cancer Res.**, p. 2429–2435, 2012.
- HUANG, M. et al. Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of CD44+CD24-cells through SDF-1/CXCR4 interaction. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 22, p. 29:80, jun. 2010.
- HWANG, R.F. et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. **Cancer Res.**, v. 68, p. 918-926, 2008.
- ISHII G. et. al. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 2015
- JENSEN, D.H. et al. Single cell migration in oral squamous cell carcinoma - possible evidence of epithelial-mesenchymal transition in vivo. **J. Oral Pathol. Med.**, v.44, n.9, p. 674-679, out. 2015.
- JIA, J. et al. FAP- $\alpha$  (Fibroblast activation protein- $\alpha$ ) is involved in the control of human breast cancer cell line growth and motility via the FAK pathway. **BMC Cell Biol.**, v. 15, n.16, 2014.
- JOHNSON, R.L. et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. **Science**, v.272, p.1668–1671, 1996.
- JOTZU, C. et al. Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. **Cell Oncol.**, v. 34, n. 1, p. 55-67, fev. 2011.
- JUNG, Y.Y.; KIM, H.M.; KOO, J.S. The role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer pathobiology. **Histol. Histopathol.**, n.2, p. 11700, 2015.
- JUNG, D.W. et al. Tumor-stromal crosstalk in invasion of oral squamous cell carcinoma: a pivotal role of CCL7. **Int. J. Cancer**. v. 127, n.2, p.332-344, jul. 2010 Jul.
- JUNKER, J. P. et al. A predictive model of bifunctional transcription factor signaling during embryonic tissue patterning. **Dev. Cell**, v. 31, p. 448–460, 2014.
- KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 16, n. 9, p. 582-98, ago. 2016.
- KELLERMANN, M.G. et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, v. 51, n. 6, p. 849–853, 2007.
- KELLERMANN, M.G. et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. **Oral Oncol.**, v. 44, n. 5, p. 509–517, 2008.
- LAWAL, A.O.; ADISA, A.O.; EFFIOM, O.A. A review of 640 Oral squamous cell carcinoma cases in Nigeria. **J. Clin. Exp. Dent.**, v.9, n.6, p.767-771, jun. 2017
- LEE, J. J. et al. Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, n. 111, v. 30, p. 3091-100, jul. 2014.

LEEF, G.; THOMAS, G.M. Molecular communication between tumor-associated fibroblasts and head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, n. 49, p. 381–386, 2013

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

LEWIS, M. P. et al. Tumour-derived TGF-beta1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. **Br. J. Cancer**, v. 90, n. 4, p. 822–32, 2004.

LIAO, Y. et al. Clinical implications of fibroblast activation protein- $\alpha$  in non-small cell lung cancer after curative resection: a new predictor for prognosis. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.139, n.9, p.1523-1528, set., 2013.

LIAO, X. et al. Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation. **Carcinogenesis**, v.30, n.1, p. 131-40, jan. 2009.

LIANG, R. et al. The transcription factor GLI2 as a downstream mediator of transforming growth factor- $\beta$ -induced fibroblast activation in SSc. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 76, n. 4, p. 756-764, abr. 2017.

LIN, J. et al. Carcinoma-associated fibroblasts promotes the proliferation of a lingual carcinoma cell line by secreting keratinocyte growth factor. **Tumor Biol.**, v. 32, p. 597–602, 2011.

LIN N. et al., Significance of oral cancer-associated fibroblasts in angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 46, p. 21-30, 2017.

LIU, Y. et al. Separation, cultivation and biological characteristics of oral carcinoma-associated fibroblasts. **Oral Dis.**, v. 12, n. 4, p. 375-380, jul. 2006.

LYGOE, K. A. et al. Role of vitronectin and fibronectin receptors in oral mucosal and dermal myofibroblast differentiation. **Biol. Cell** v. 99, p. 601–614, 2007.

MAZUL, A. L. et al. Prognostic significance of non-HPV16 genotypes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 61, p. 98-103, Out. 2016.

MCMILLAN, R.; MATSUI, W. Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. **Clin. Can. Res.**, v. 18, n. 18, p. 4883–4888, set. 2012.

MEZAWA, Y.; ORIMO, A. The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. **Cell Tissue Res.**, v. 365, n. 3, p. 675-89, set. 2016.

MINK, S.R. et al. Cancer-associated fibroblasts derived from EGFR-TKI-resistant tumors reverse EGFR pathway inhibition by EGFR-TKIs. **Mol Cancer Res.**, v.6, p. 809-820, Jun. 2010.

MOHAN, M.; JAGANNATHAN, N. Oral field cancerization: an update on current concepts. **Oncol. Rev.**, v.8, n.1, p: 244, jun. 2014.

- MPEKRIS, F. C. et al. Sonic-Hedgehog pathway inhibition normalizes desmoplastic tumor microenvironment to improve chemo- and nanotherapy. **J. Control. Release.** v.261, p. 105–112, set., 2017.
- MUELLER, L. et al. Stromal fibroblasts in colorectal liver metastases originate from resident fibroblasts and generate an inflammatory microenvironment. **Am. J. Pathol.**, v.171, n.5, p. 1608-18, nov. 2007.
- OLUMI, A. F. et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. **Cancer Res.**, v.59, p.5001-5002, 1999.
- ORIMO, A. et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. **Cell**, v.121, p. 335-348, 2005.
- ÖHLUND, D.; ELYADA, E.; TUVESON, D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. **J. Exp. Med.**, v.211, n.8, p.1503-23, jul. 2014.
- PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Lancet.**, v. 133, p. 571–573, 1889.
- PASTORINO, L. et al. Identification of a SUFU germline mutation in a family with Gorlin syndrome. **Am. J. Med. Genet. A.**, v.149, p.1539–1543, 2009.
- PETERSEN, O.W. et al. Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. **Am. J. Pathol.**, v.162, n.2, p.391-402, fev. 2003.
- PETERSON, K.A. et al. Neural-specific Sox2 input and differential Gli-binding affinity provide context and positional information in Shh-directed neural patterning. **Genes Dev.**, v.26, p.2802–2816, 2012.
- PIETRAS, K.; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Exp. Cell. Res.** v. 316, n.8, p.1324-31, mai. 2010.
- PINTER, M. et al. Hedgehog inhibition reduces angiogenesis by downregulation of tumoral VEGFA expression in hepatocellular carcinoma. **United Eur. Gastroenterol. J.**, v.1, n.4, p. 265–275, ago. 2013.
- PRIME, S.S. et al. Fibroblast activation and senescence in oral cancer. **J. Oral Pathol. Med.**, v.46, n.2, p. 82-88, fev. 2017.
- QUANTE, M. et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. **Cancer Cell.**, v.19, n.2, p. 257-272, fev. 2011.
- RIVERA, C. et al. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. **Oral Oncol.**, v.72, p: 38-47, set. 2017.
- ROBERTS, K.J.; KERSHNER, A.M.; BEACHY, P.A. The Stromal Niche for Epithelial Stem Cells: A Template for Regeneration and a Brake on Malignancy. **Cancer Cell.**, v. 32, n. 4, p. 404-410, out. 2017.

RODRIGUES, P.C. et al. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 43, n. 7, p. 795-801, jul. 2014.

ROESSLER, E. et al. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. **Nat. Genet.** v.14, p. 357-360, 1996.

SANTI, A.; KUGERATSKI, F.G.; ZANIVAN, S. Cancer Associated Fibroblasts: The Architects of Stroma Remodelling. **Proteomics**, dez. 2017

SCALES, S. J.; DE SAUVAGE, F. J. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 30, n. 6, p. 303–312, jun. 2009.

SGARAMELLA, N. et al. Expression of p16 in squamous cell carcinoma of the mobile tongue is independent of HPV infection despite presence of the HPV-receptor syndecan-1. **Br. J. Cancer**, v.113, n.2, p.321-326, 2015.

SHAO, Z. M.; NGUYEN, M.; BARSKY, S. H. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. **Oncogene**, v.19, n. 38, p. 4337–4345, 2000.

SHIN, K. et al. Hedgehog signaling restrains bladder cancer progression by eliciting stromal production of urothelial differentiation factors. **Cancer Cell**, v. 26, p. 521–533, 2014.

SLAUGHTER, D.P.; SOUTHWICK, H.W.; SMEJKAL, W. Field cancerization in oral Stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. **Cancer**, v. 6, n. 5, p. 963-968, set. 1953.

SMITH, M. J. et al. Germline mutations in SUFU cause *Gorlin* syndrome-associated childhood medulloblastoma and redefine the risk associated with PTCH1 mutations. **J. Clin. Oncol.**, v.32, p.4155–61, 2014.

SNEDDON, J.B. et al. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.103, p. 14842–14847, 2006.

SOBRAL, L.M. et al. Isolation and characterization of myofibroblast cell lines from oral squamous cell carcinoma. **Oncol. Rep.**, v.25, n. 4, p.1013–20, 2011a.

SOBRAL, L.M. et al. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. **Oral Oncol.**, v. 47, p. 840–846, 2011b

SONG, S. et al. PDGFRb+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. **Nat. Cell Biol.**, v. 7, p. 870–879, 2005.

ST-JACQUES, B.; DASSULE H.R.; KARAVANOVA I. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. **Curr. Biol.**, v.8, n.19, p.1058-68, 1998.

STEINWAY, S.N. et al. Network modeling of TGFβ signaling in hepatocellular carcinoma epithelial-to-mesenchymal transition reveals joint sonic hedgehog and Wnt pathway activation. **Cancer Res.**, v.74, n.21, p.5963-77, Nov., 2014.

STRUTZ, F. et al. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. **Kidney Int.**, v. 57, n. 4, p. 1521–1538, 2000.

SUGIMOTO, H. et al. Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. **Cancer Biol. Ther.**, v. 5, n. 12, p.1640-1646, dez. 2006.

SYN W. K. et al. Hedgehog-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and fibrogenic repair in nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v.137, n.4, p. 1478-1488, out. 2009.

TAKAHASHI, H. et al. Immunosuppressive activity of cancer-associated fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma, v.64, p.1407-1417, **Cancer Immunol. Immunother.**, 2015.

TAKAHASHI, H. et al. Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages, **Oncotarget**, v.8, n.5, p.8633-8647, 2017.

TAKEBE, N.; WARREN, R.Q.; IVY, S.P. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. **Breast Cancer Res.**, v.13, n.3, p.211, jun. 2011.

THEUNISSEN, J.W.; DE SAUVAGE, F.J. Paracrine Hedgehog Signaling in Cancer. **Cancer Res.**, v.69, p. 6007-6010, 2009.

TIAN, H. et al. Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 106, n.11, p.4254-4259, mar. 2009.

TOGO, S. et al. Carcinoma-Associated Fibroblasts Are a Promising Therapeutic Target. **Cancer**, n. 5, v. 1, p. 149-169, 2013.

TURUNEN, S.P.; TATTI-BUGAEVA, O.; LEHTI, K. Membrane-type matrix metalloproteases as diverse effectors of cancer progression. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1864, n.11, p. 1974-1988, nov., 2017.

VALENTI, G. et al. Cancer Stem Cells Regulate Cancer-Associated Fibroblasts via Activation of Hedgehog Signaling in Mammary Gland Tumors. **Cancer Res.**, v. 77, n. 8, p.2134-2147, abr. 2017.

VALVERDE, L.F. et al. Macrophages and endothelial cells orchestrate tumor-associated angiogenesis in oral cancer via hedgehog pathway activation. **Tumor Biol.**, v.37, n.7, p. 9233-9241, jul. 2016.

VARNAT, F. et al. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signaling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion: HH-GLI1 in colon cancers, metastases and stem cells. **EMBO Mol. Med.**, v.1, p. 338-351, 2009.

VERED, M. et al. Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma. **Int. J. Cancer.**, v. 127, n. 6, p.1356-1362, set. 2010.

WALSH, P.C. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. **J. Urol.**, v.1, p. 169-173, 2005.

WALTER, K.; OMURA, N.; HONG, S.M. Overexpression of Smoothed activates the Sonic Hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer associated fibroblasts. **Clin. Can. Res.**, v.16, n. 6, p. 1781-1789, 2010.

WANG, Z.S. et al. Significance and prognostic value of Gli 1 and Snail/E cadherin expression in progressive gastric cancer. **Tumour Biol.**, v. 35, p.1357-1363, 2014.

WEN, X. et al. Fibroblast Activation Protein- $\alpha$ -Positive Fibroblasts Promote Gastric Cancer Progression and Resistance to Immune Checkpoint Blockade. **Oncol. Res.**, v. 25, n. 4, p. 629-640, abr. 2017.

WORTHLEY, D. L. et al. Human gastrointestinal neoplasia-associated myofibroblasts can develop from bone marrow-derived cells following allogeneic stem cell transplantation. **Stem Cells.**, v.27, n.6, p.1463-1468, jun. 2009.

WU, F. et al. Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. **Cell Chem. Biol.**, v.24, n.3, p.252-280, mar. 2017.

XU, Q. S. et al. Prognostic value of pathologic grade for patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Dis.**, ago. 2017.

XU, X.; SU, B.; XIE, C. Sonic hedgehog-Gli1 signaling pathway regulates the epithelial mesenchymal transition (EMT) by mediating a new target gene, S100A4, in pancreatic cancer cells. **PLoS One.**, v. 9, n. 7, p. 96441, Jul., 2014.

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

YANG, G. et al. The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 16472-7, 2006.

ZEISBERG, E. M. et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. **Cancer Res.**, v. 67, n. 21, p. 10123-10128, nov. 2007.

ZHANG, C. et al. Fibroblast growth factor receptor 2-positive fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in esophageal carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v.15, p. 4017-27, 2009.

ZHANG, W. et al. Fibroblast-derived MT1-MMP promotes tumor progression in vitro and in vivo. **BMC Cancer.**, v. 6, p.52, mar. 2006.

ZHOU, B. et al. A role for cancer-associated fibroblasts in inducing the epithelial-to-mesenchymal transition in human tongue squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 43, n. 8, p.585-592, set.2014.

ZURAWEL, R. H. et al. Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 27, p. 44-51, 2000.

**ANEXO A -**

Tabela. Associação dos graus histológicos da imunoposição dos marcadores  $\alpha$ -SMA, FAP, S100A4, SHH, IHH, GLI1 e MMP14 em CEBs.

	<i>a-SMA (estroma)</i>					<i>FAP (estroma)</i>					<i>S100A4 (estroma)</i>					<i>SHH (parênquima)</i>								
	Escores n				Total n	p (valor)	Escores n				Total n	p (valor)	Escores n				Total n	p (valor)	Escores n				Total n	p (valor)
	0	1+	2+	3+	0		1+	2+	3+	0	1+		2+	3+	0	1+	2+		3+	0	1+	2+	3+	
<b>BD</b>	4	5	3	6	18		15	1	1	1	18		0	3	5	10	18		2	2	1	13	18	
<b>MD</b>	19	6	4	16	45		39	5	1	0	45		4	4	10	27	45		4	6	4	31	45	
<b>PD</b>	2	2	1	2	7		6	1	0	0	7		0	1	2	4	7		2	3	2	0	7	
<b>BD x MD</b>						0,51						0,59						0,82						0,96
<b>BD x PD</b>						0,72						0,71						0,90						0,26
<b>MD X PD</b>						0,92						0,93						0,80						0,22
	<i>IHH (Parênquima)</i>					<i>GLI1 (Parênquima)</i>					<i>MMP14 (Parênquima)</i>													
	Escores n				Total n	p (valor)	Escores n				Total n	p (valor)	Escores n				Total n	p (valor)						
	0	1+	2+	3+	0		1+	2+	3+	0	1+		2+	3+	0	1+	2+		3+					
<b>BD</b>	7	3	3	5	18		7	2	3	6	18		7	1	1	9	18							
<b>MD</b>	28	5	7	5	45		8	9	9	19	45		8	11	8	18	45							
<b>PD</b>	5	2	0	0	7		0	4	0	3	7		0	1	2	4	7							
<b>BD x MD</b>						0,73																		
<b>BD x PD</b>						0,01*																		
<b>MD X PD</b>						0,07																		

Nota: BD: Bem diferenciado/ MD: Moderada mentediferenciado/ PD: Pouco diferenciado