



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EXPRESSÃO DE COMPONENTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO
SONIC HEDGEHOG (HHIP, PTCH1 e SHH) e VEGF-A EM
CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL: ASSOCIAÇÃO
COM IMUNOMARÇÃO DE VEGF-A E MICRODENSIDADE
VASCULAR.**

CAROLINE BRANDI SCHLAEPFER SALES

**Salvador – Bahia – Brasil
2012**



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

**EXPRESSÃO DE COMPONENTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO
SONIC HEDGEHOG (HHIP, PTCH1 e SHH) e VEGF-A EM
CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL: ASSOCIAÇÃO
COM IMUNOMARÇÃO DE VEGF-A E
MICRODENSIDADE VASCULAR**

CAROLINE BRANDI SCHLAEPFER SALES

Orientador: Clarissa Araújo Silva Gurgel

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

Salvador – Bahia – Brasil
2012

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

Sales, Caroline Brandi Schlaepfer
S163e Expressão de componentes da via de sinalização *sonic hedgehog* (HHI, PTCH1 e SHH) e VEGF-A em carcinoma escamocelular: associação com imunomarcção de VEGF-A e microdensidade vascular.[manuscrito] / Caroline Brandi Schlaepfer Sales.- 2012.
69 f. if.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, 2012.
Orientador: Dr. Clarissa Araújo Silva Gurgel.

1. Neoplasias bucais 2. Carcinoma de células escamosas 3.
Neovascularização patológica 4. Vias de sinalização 5. Biologia Molecular


CDU 616-31-006

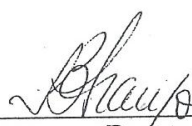
“EXPRESSÃO DE COMPONENTES DA VIA DE SENALIZAÇÃO SONIC HEDGEHOG (HHIP, PTCH1 e SHH) E VEGF-A EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL: ASSOCIAÇÃO COM IMUNOMARÇÃO DE VEGF-A E MICRODENSIDADE VASCULAR.”

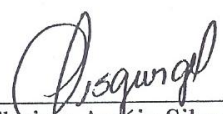
CAROLINE BRANDI SCHLAEPTEK SALES

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA


Dra. Marcilei Eliza C. Buim
Pesquisadora
Hosp. A. C. Camargo


Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araujo
Professor Associado
UFBA


Dra. Clarissa Araújo Silva Gurgel
Professora Adjunta
UFBA

A minha mãe Iola,
Por confiar no meu potencial e me apoiar, ouvindo meus problemas e me dando colo, em
todas as etapas da minha caminhada.

Aos meus irmãos Camila e Heron,
Que estão sempre ao meu lado e me alegram nos momentos difíceis.

Ao meu pai (*in memoriam*) Heron,
Que me ensinou a batalhar pelos meus sonhos e a importância de continuar buscando o
conhecimento.

Ao meu amor Bruno,
Por me incentivar, apoiar e me acolher nos momentos de angústia. Agradeço por estar
presente neste momento tão importante de minha vida. Amo você!

A minha orientadora,
Que está presente em minha vida desde 2006, foi ela quem me apresentou ao mundo da
pesquisa e desde então vem me incentivando a buscar cada vez mais conhecimento. Agradeço
por acreditar no meu potencial, por se preocupar comigo e por me motivar a buscar desafios
cada vez maiores na pesquisa e na carreira acadêmica. Ter Dra. Clarissa como orientadora é
um privilégio, pois o seu amor pela profissão é contagiante e instigante. Ainda posso
acrescentar que Clara é também uma grande amiga, aquela que me escuta e me aconselha
sempre que preciso.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Dr. Eduardo Ramos,

Meu primeiro orientador, agradeço pela oportunidade de me iniciar nos primeiros passos da carreira científica, ser uma estudante de iniciação científica. Durante este período, aprendi a desenvolver habilidades no laboratório, nas apresentações, no desenvolvimento de manuscritos, entre outras atividades... Além de aprender a amar a pesquisa. Obrigada pela atenção, calma e paciência, sempre que precisei o Senhor esteve disponível e sei que, ainda hoje, me recebe de braços abertos.

Ao Dr. Fernando Soares,

Agradeço por abrir as portas do Laboratório de Patologia Investigativa do Hospital do Câncer AC Camargo, no qual tive a oportunidade de executar os experimentos que deram origem a este estudo. Um profissional ímpar, pois incentiva a pesquisa e acredita na troca de conhecimentos entre grupos científicos através de parcerias.

À Dra. Marcilei Buim,

Tive a oportunidade de desenvolver meus experimentos sob sua orientação, obrigada pela atenção, cuidado e confiança. Este período foi um grande aprendizado e um incentivo, pois estive ao lado de uma profissional muito competente e comprometida com a pesquisa.

À Renata Oliveira,

Minha grande amiga e companheira, que esta ao meu lado desde o início da faculdade, posso dizer que crescemos juntas no mundo das ciências. Fico muito feliz por ter uma pessoa tão comprometida e leal participando da minha carreira e vida pessoal. Obrigada por me incentivar, me apoiar e me ajudar neste percurso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós,

Obrigada pelo carinho, pela confiança, pelos conselhos e pelo amor!!!

A todos da minha família,

Sei que vocês acreditam em mim, por isso tive o apoio de vocês em todas as decisões que já tomei, inclusive quando optei por fazer o mestrado. Sinto-me muito especial por ter vocês ao meu lado, sempre me incentivando, apoiando e lógico, alegrando!

Às meninas,

Debby, Taty, Tynha, Carol, Rana, Mile e Cris, que me acompanham desde a adolescência. Vocês me dão força, me apoiam, me dão colo e me alegram sempre que preciso, sei que posso contar com vocês, e neste momento vocês estavam lá. Tenho sorte de ter amigas tão especiais como vocês.

Às Guels,

Alineide, Poli, Saminha, Lari e Renatinha, tive a oportunidade de conhecê-las na faculdade e agora não largo mais. Desde que nos formamos tivemos que trilhar nossos caminhos, mas vocês me ajudaram a tomar esta decisão e estão comigo nesta. Amo vocês!!!

Aos colegas de mestrado,

Com certeza vocês tornaram este momento muito divertido, sei que nesta turma encontrei apoio e união. Não poderia deixar de citar Diana, Bárbara, Jamile e Dani com quem dei muitas risadas e troquei conhecimento. Posso falar também de João que me ajudou a resgatar meu carro rebocado, depois da aula de didática, rs!! Luana e Leina, minhas parceiras nos experimentos de patologia experimental. Poderia falar também de Manuela, quantas caronas eu peguei com você? rs!!! Luana merece um lugar especial, pois me deu a luz quando eu achava que estava no escuro.

Aos professores da pós-graduação,

Com eles tive a oportunidade de entender melhor o mundo da pesquisa, devido a dedicação destes docentes.

À coordenação de ensino,

Que me ajudavam a resolver todas as minhas angústias e estavam sempre disponíveis para tirar minhas dúvidas.

Ao Grupo de Biopatologia,

Fazer parte deste grupo me possibilitou o aprendizado e o crescimento profissional.

Ao Prof. Jean,

Tenho orgulho de dizer que faço parte do mesmo grupo de pesquisa que ele, um profissional admirável, um pesquisador muito curioso e que sempre incentiva a mim e aos seus estudantes a buscarem o conhecimento.

Às estudantes de iniciação científica,

Ludmila, Laís, Nanda, Manuela e Bárbara, obrigada por me socorrerem sempre que precisei e por me proporcionarem momentos de alegria, quando tudo parecia tão estressante.

À Ana Carvalho,

Sempre disposta a tirar minhas dúvidas e atender minhas ligações, até mesmo nos seus momentos de descanso. Obrigada Ana, pela paciência, rs!!

À Cristina Mota,

Um exemplo de profissional, obrigada por ser atenciosa e paciente comigo.

Aos colegas do LPBM,

Por me acolherem e abrir as portas toda vez que precisei.

A todos do hospital do câncer AC Camargo,

Agradeço a todos pela oportunidade, pelo cuidado e atenção durante o período que fiquei em São Paulo. Posso citar alguns nomes especiais Dra Silvia e Dra Cláudia, sempre dispostas a tirar minhas dúvidas e pela companhia no almoço. A Ivan da imunohistoquímica e Cláudia da histopatologia, que me socorreram muitas vezes. A Renata e Andreza, estudantes orientadas por Dra. Marcilei, que me ajudaram a executar os experimentos e me acolheram com muito carinho.

À UFBA,

Minha faculdade e também uma grande escola da vida, na qual tive a oportunidade de amadurecer e me encontrar como profissional.

Ao CNPq,

Pelo apoio financeiro durante o mestrado.

À FAPESB,

Por financiar este projeto.

Ao CpqGM,

Um centro de pesquisa que nos oportuniza a formação de profissionais que contribuem para ampliar o conhecimento científico.

RESUMO

EXPRESSÃO DE COMPONENTES DA VIA DE SINALIZAÇÃO *SONIC HEDGEHOG* (HHIP, PTCH1 e SHH) e VEGF-A EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL: ASSOCIAÇÃO COM IMUNOMARÇÃO DE VEGF-A E MICRODENSIDADE VASCULAR. Os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento do carcinoma escamocelular oral (CECO) ainda são pouco conhecidos. Vias de sinalização que participam do desenvolvimento embrionário, como a via *Sonic Hedgehog* (SHH), podem estar associadas ao desenvolvimento de tumores e ainda participar da progressão tumoral através do estímulo a angiogênese. Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de expressão gênica de componentes da via de sinalização SHH, *Sonic Hedgehog* (SHH), *Patched 1* (PTCH1) e *Hedgehog interacting protein* (HHIP), que possam estar relacionados a angiogênese em CECO, bem como os níveis de expressão do *vascular endothelial growth factor* (VEGF-A) e a microdensidade vascular (MDV) nestes tumores. Após aprovação do CEP (Parecer 229/10), a casuística foi composta por 66 casos de CECO no total. Para as reações de PCR quantitativo (qPCR) foram utilizadas amostras criopreservadas de 50 casos de CECOs, 8 casos de Mucosa Adjacente ao Tumor (MAT) e 2 casos de Mucosa Não Neoplásica de paciente saudável (MNN). Após extração de RNA, o DNA complementar foi obtido com o auxílio de High-Capacity cDNA Reverse-Transcription. As reações de qPCR foram conduzidas no aparelho ABI Prism 7900 utilizando o sistema *Taqman*, sendo a quantificação relativa avaliada pelo método comparativo de Cq ($\Delta\Delta Cq$). Foram utilizados 56 blocos parafinizados para a confecção do *tissue microarray* (TMA) e análise da expressão de proteínas VEGF-A e CD34 (MDV), utilizando sistema EnVision AdvancedTM. Foi detectada expressão de HHIP e PTCH1 em CECO e MAT indicando ativação da via SHH nestas lesões. Dezesete (34%) casos de CECO não apresentaram expressão de SHH, os outros 33 (66%) tumores expressaram tal gene, indicando que a ativação desta via de sinalização pode ser através ou não do ligante. Correlação positiva foi observada entre a expressão de SHH e HHIP ($rs=0.29$; $p=0.044$, Teste de Spearman) e SHH e PTCH1 ($rs=0.49$; $p=0.0003$, Teste de Spearman) em CECO. A correlação positiva entre SHH e VEGF-A ($rs=0.37$; $p=0.0086$; Teste de Spearman) sugere uma participação da via SHH na angiogênese em CECOs, ao mesmo tempo maiores níveis de expressão de VEGFA, parece favorecer um aumento da densidade de vasos sanguíneos ($rs=0.55$; $p=0.0050$; Teste de Spearman). Maiores níveis de transcritos e da proteína VEGF-A estavam relacionados a CECOs com invasão perineural e moderadamente diferenciados. Por último, maior expressão de VEGF-A foi detectada em MAT ($p=0.034$, Teste de Mann Whitney). Assim, a correlação positiva entre a expressão gênica de SHH e VEGF-A indica esta via pode participar da angiogênese tumoral. Além disso, isoladamente, a expressão do gene VEGF-A foi o fator que mais contribui para uma maior MDV e uma maior expressão deste, em nível de transcrito e de proteína, esteve relacionado a CECO de comportamentos mais agressivos. A expressão de HHIP, PTCH1 e VEGF-A em MAT indica que via SHH pode estar ativada nas margens tumorais e, corrobora para a existência de um campo de cancerização que envolve tecidos fenotipicamente normais. Além disso, maior expressão de VEGF-A nesta localização, sugere que a margem tumoral pode participar na secreção de fatores de crescimento para o tumor.

Palavras-chave: Neoplasias Bucais. Carcinoma de Células Escamosas. Vias de Sinalização. Neovascularização Patológica. Biologia Molecular.

ABSTRACT

EXPRESSION OF COMPONENTS OF SONIC HEDGEHOG PATHWAY (HHIP, PTCH1 AND SHH) VEGF-A IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS: ASSOCIATION WITH EXPRESSION OF VEGF-A PROTEIN AND MICROVESSEL DENSITY. Sonic Hedgehog (SHH) signaling has been implicated in tumor development and progression by stimulating angiogenesis, and its molecular mechanisms involving these events are little known in oral squamous cell carcinomas (OSCC). The aim of this study was to characterize the transcripts expression involved in the SHH pathway (SHH, PTCH1, HHIP, VEGF-A) and microvessel density in these neoplasms. In this study, a total of 50 CECOs, eight non-tumor epithelium adjacent to oral cancer (NTEA), and two oral mucosa obtained from healthy individuals were included. After RNA extraction, complementary DNA was obtained using the High-Capacity cDNA Reverse-Transcriptio. qPCR reactions were conducted in the ABI Prism 7900 using Taqman Gene Expression System. Cq ($\Delta\Delta CQ$) relative quantification method was performed for gene expression analysis. Fifty six paraffin-embedded specimens of OSCC were used for tissue microarray (TMA) and by immunohistochemistry, VEGF and CD34 using EnVision System Advanced TM were used. *HHIP* and *PTCH1* transcripts were detected in OSCC and NTEA indicating their SHH pathway activation. Seventeen (34%) OSCC cases were negative for *SHH* gene expression. This results indicate that activation of SHH pathway may be either through SHH ligand or not. Our results showed a positive correlation between *SHH* and *HHIP* (rs=0.29; p=0.044, Spearman test) and *SHH* and *PTCH1* (rs=0.49; p=0.0003, Spearman test) gene expression in OSCC. The positive correlation between the expression of *SHH* and *VEGF-A* (rs=0.37; p=0.0086; Spearman test) suggests an involvement of the SHH pathway on angiogenesis of OSCC, whereas higher levels of VEGF-A expression seems to increase the microvessel density of OSCC (rs=0.55;p=0.0050; Sperman test). Higher levels of transcripts and VEGF-A protein were related to OSCC with perineural invasion and those moderately differentiated. Finally, increased expression of VEGF-A was detected in NTEA (p = 0.034, Mann Whitney test). Thus, the positive correlation between the gene expression of *SHH* and *VEGF-A* indicates that pathway could participate in tumor angiogenesis. Moreover, VEGF-A gene expression was the only factor that contributed to a greater MVD in our series. In addition, increased expression of this gene and protein was related to more aggressive behavior of OSCC. The expression of *HHIP*, *PTCH1* and *VEGF-A* in NTEA also indicates that SHH pathway can be activated in the tumor margins and might suggest existence of a field cancerization involving phenotypically normal cells. At the same time, increased gene expression of *VEGF-A* in this location suggests that adjacent cells to oral cancer could actively participate in the secretion of important growth factors to the tumor developing.

Keywords: Mouth Neoplasms. Carcinoma Squamous Cell. Neovascularization. Pathologic. Signal Transduction. Molecular Biology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18S	Sub-unidade menor de ribossomos de seres eucarióticos
β	“beta”. Segunda letra do alfabeto grego
μm	Unidade de medida de tamanho micrômetros
μL	Unidade de medida de quantidade microlitro
ng	Unidade de medida de quantidade nanograma
°C	Unidade de medida de temperatura graus Celsius
mm	Unidade de medida de tamanho milímetro
mm ²	Unidade de medida de tamanho milímetro quadrado
ng/μL	nanograma por microlitro
vaso/mm ²	vaso por milímetro quadrado
%	Unidade de valor percentual
A	Adenina
Ang-1	Refere-se a proteína Angiopietina-1
Ang-2	Refere-se a proteína Angiopietina-2
<i>Bcl-2</i>	Refere-se ao gene <i>Human B-cell lymphoma 2</i>
BMP4	Refere-se ao inglês <i>bone morphogenetic proteins 4</i>
C	Citosina
CBC	Carcinoma Basocelular
cDNA	Do inglês, <i>complementary DNA</i>
CEC	Carcinoma Escamocelular
CECO	Carcinoma Escamocelular Oral
CE	Célula Endotelial
C-ERB 2	Refere-se ao gene <i>C-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
Cq	Do inglês, <i>Quantification Cycles</i>
CPE	Célula Progenitora Endotelial
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz
<i>COUP-TFII</i>	Refere-se ao gene <i>Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors II</i>
CSNK1A1	Do inglês <i>casein kinase 1 alpha subunit</i>
DEO	Displasia Epitelial Oral
DHH	Refere-se a proteína <i>Desert Hedgehog</i>
DMBA	7,12 Dimetilbenz[a]anthracine
DP	Desvio padrão
<i>EGFR</i>	Refere-se ao gene <i>Epithelial growth factor receptor</i>
EI	Escore Imuno-histoquímico
et al.	Colaboradores
CD31	Glicoproteína CD31
CD34	Glicoproteína CD34
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
EI	Escore Imuno-histoquímico
FU	Refere-se a proteína <i>serine/threonine kinase fused</i>
G	Guanina
GANT61	Bloqueador dos fatores de transcrição Gli
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Gi	proteína heterodimérica Gi
<i>GLI</i>	Refere-se ao gene <i>Glioma-associated oncogene homolog</i>
Gli	Refere-se a proteína codificada pelo gene <i>GLI</i>
<i>GLII</i>	Refere-se ao gene <i>Glioma-associated oncogene homolog I</i>
Gli1	Proteína codificada pelo gene <i>GLI1</i>
Gli2	Refere-se a proteína <i>family zinc finger 2</i>
Gli3	Refere-se a proteína <i>family zinc finger 3</i>
GRK2	Refere-se ao inglês <i>G protein-coupled receptor kinase 2</i>
HE	Hematoxilina Eosina
<i>HHIP</i>	Refere-se ao gene <i>hedgehog interacting protein</i>
HHIP	Refere-se a proteína <i>hedgehog interacting protein</i>
HPV	Refere-se ao inglês <i>Human Papiloma virus</i>
HUVEC	Refere-se ao inglês <i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IHH	Refere-se a proteína <i>Indian Hedgehog</i>
IHQ	Imunohistoquímica
IgG	Imunoglobulina G
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MAT	Mucosa adjacente ao tumor
MDV	Microdensidade vascular
MMP-9	Refere-se a proteína de matriz metaloproteinase 9
MNN	Mucosa não-neoplásica de paciente saudável

N2	Amostras compostas por mucosa adjacente ao tumor
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPN	Osteopontina
<i>p16</i>	Refere-se ao gene <i>p16</i>
<i>p53</i>	Refere-se ao gene <i>p53</i>
p53	Refere-se ao gene ou proteína p53
PBS	Do inglês, <i>Phosphated buffered solution</i>
PKA	Do inglês, <i>Protein Kinase A</i>
<i>PTCH1</i>	Referre ao gene <i>Patched homolog 1</i>
PTCH1	Refere-se a proteína <i>Patched 1</i>
PTCH2	Refere-se a proteína <i>Patched 2</i>
qPCR	Do inglês, Quantitative Polymerase Chain Reaction
<i>Rb</i>	Refere-se ao gene Retinoblastoma
Rb	Refere-se a proteína Retinoblastoma
Rhoa	Refere-se ao gene <i>ras homolog gene family, member A</i>
ROCK	Do inglês, <i>Rho kinase</i>
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	Do inglês, <i>Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction</i>
SHH	Refere-se ao gene <i>Sonic Hedgehog homolog (Drosophila)</i>
SHH	Refere-se a proteína <i>Sonic Hedgehog</i>
SCBCN	Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevoíde
SRF	Do inglês, <i>serum response factor</i>
SUFU	Refere-se a proteína <i>Supressor of Fused</i>
T	Timina
TMA	Do inglês, <i>Tissue microarray</i>
TNM	Do inglês, <i>Tumor lymph nodes metastasis</i>
VEGF	Refere-se a proteína Vascular endothelial growth factor
<i>VEGF-A</i>	Refere-se ao gene Vascular endothelial growth factor A
VEGF-A	Refere-se a proteína Vascular endothelial growth factor A
VEGFR-1	Refere-se a proteína Vascular endothelial growth factor receptor 1
VEGFR-2	Refere-se a proteína Vascular endothelial growth factor receptor 2
UFBA	Universidade Federal da Bahia
ZEB1	Repressor de E-caderina do inglês <i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
ZEB2	Repressor de E-caderina do inglês <i>zinc finger E-box binding homeobox 2</i>
WNT	Do inglês, <i>wingless type</i>
WNT2B	Refere-se ao ligante <i>wingless type 2B</i>
WNT5A	Refere-se ao ligante <i>wingless type 5^a</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de progressão genética: mudanças genéticas associada com a progressão histopatológica do CEC de cabeça e pescoço baseada na perda de material cromossômico (perda de alelo). Fonte: Califano et al. (1996).....	19
Figura 2	Demonstração esquemática do funcionamento da via SHH. Fonte: Altaba, 1999.....	22
Figura 3	Representação da ação da ciclopamida (GDC0449) no bloqueio da via <i>hedgehog</i> . Fonte: Lord; Ashworth (2010).....	23
Figura 4	Modelo de ativação de CE pela via SHH independente de Gli (Via não canônica). Fonte: Adaptado de Chinchila et al. (2010).....	26
Figura 5	Comparação da expressão relativa de <i>HHIP</i> entre CECOs e MAT. Salvador, Bahia, 2011.....	36
Figura 6	Comparação da expressão relativa de <i>PTCH1</i> entre CECOs e MAT. Salvador, Bahia, 2011.....	36
Figura 7	Comparação da expressão relativa de <i>SHH</i> entre CECOs e MAT. Salvador, Bahia, 2011.....	37
Figura 8	Comparação da expressão relativa de <i>VEGF-A</i> entre CECOs e MAT. Salvador, Bahia, 2011.....	37
Figura 9.	Perfil de expressão dos genes <i>HHIP</i> , <i>PTCH1</i> , <i>SHH</i> e <i>VEGF-A</i> em CECO. Salvador, Bahia, 2011.....	38
Figura 10	Perfil de expressão dos genes <i>HHIP</i> , <i>PTCH1</i> , <i>SHH</i> e <i>VEGF -A</i> em MAT. Salvador, Bahia, 2011.....	38
Figura11	Correlação entre <i>SHH</i> e <i>HHIP</i> em CECOs. .Salvador , Bahia, 2011.....	39
Figura 12	Correlação entre <i>SHH</i> e <i>PTCH1</i> em CECOs. .Salvador , Bahia, 2011.....	39
Figura 13	Correlação entre <i>SHH</i> e <i>VEGF-A</i> em CECOs. .Salvador , Bahia, 2011.....	39
Figura 14	Comparação da expressão de <i>VEGF-A</i> entre CECOs classificados como T1-T2 e T3-T4. .Salvador , Bahia, 2011.....	42
Figura 15	Comparação da expressão de <i>VEGF-A</i> entre CECOs estágio I-II e III-IV. Salvador, Bahia, 2011.....	42
Figura 16	Comparação da expressão de <i>VEGF-A</i> entre CECOs N0 e N1-N3. Salvador, Bahia, 2011.....	42
Figura 17	Comparação da expressão de <i>VEGF-A</i> entre CECOs com e sem invasão vascular. Salvador, Bahia, 2011.....	42
Figura 18	Comparação da expressão de <i>PTCH1</i> entre com e sem infiltração perineural. Salvador, Bahia, 2011.....	43
Figura 19	Comparação da expressão de <i>SHH</i> entre CECOs bem e moderadamente diferenciados. Salvador, Bahia, 2011.....	43
Figura 20	Comparação da expressão de <i>SHH</i> entre CECOs em diferentes localidades. .Salvador , Bahia, 2011.....	43
Figura 21	Figura 21. IHQ. (A) e (B) Padrão de imunomarcção da proteína CD34 em endotélios de áreas de “ <i>Hot Spots</i> ” em Carcinoma Escamocelular de boca. (C) e (D) VEGF. Imunomarcção citoplasmática granular em células do parênquima tumoral. (E) Imunomarcção citoplasmática granular em fibroblastos do estroma tumoral. (F) Imunomarcção citoplasmática granular em células endoteliais.....	48
Figura 22	Distribuição dos EIS e percentual de células marcadas de VEGF-A na lâmina de TMA. Salvador, Bahia, 2011.....	46
Figura 23	Correlação de <i>VEGF-A</i> e MDV. Salvador, Bahia, 2011.....	49
Figura 24	Comparação da expressão de <i>VEGF-A</i> em CECOs com MDV maior e menor que 19.82 vasos/mm ² . Salvador, Bahia, 2011.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<u>Dados dos clones dos anticorpos, recuperação antigênica e diluição. Salvador, Bahia, 2011.....</u>	30
Tabela 2	<u>Características clínico-patológicas dos pacientes com CECO primário. Salvador, Bahia, 2011.....</u>	35
Tabela 3	<u>Correlações entre os genes SHH, PTCH1, HHIP e VEGF-A. Salvador, Bahia, 2011.....</u>	40
Tabela 4	<u>Comparação da expressão gênica entre os diferentes parâmetros clínicos e gradação histológica. Salvador, Bahia, 2011.....</u>	41
Tabela 5	<u>Comparação da MDV entre os diferentes parâmetros clínicos e gradação histológica. Salvador, Bahia, 2011.....</u>	45
Tabela 6	<u>Comparação dos Eis de VEGF-A entre os diferentes parâmetros clínicos e gradação histológica. Salvador, Bahia, 2011.....</u>	47
Tabela 7	<u>Correlação da expressão gênica de SHH e MDV e VEGF-A MDV. Salvador, Bahia, 2011.....</u>	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	CARCINOMA ESCAMOCELULAR ORAL (CECO)	17
2.2	A VIA <i>SONIC HEDGEHOG</i> (SHH)	20
2.3	VIA SHH E ANGIOGÊNESE	24
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	CASUÍSTICA	29
4.2	PREPARAÇÃO DE <i>TISSUE MICROARRAY</i> (TMA)	29
4.3	IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)	29
4.4	ANÁLISE IHQ	30
4.5	Estudo da expressão gênica	31
4.5.1	Isolamento de RNA total e transcrição-reversa (RT-PCR)	31
4.5.2	Reações de PCR em tempo real (qPCR)	32
4.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	32
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS	34
5.1	DADOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS	34
5.2	PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>HHIP</i> , <i>PTCH1</i> , <i>SHH</i> E <i>VEGF-A</i>	36
5.3	CORRELAÇÃO ENTRE OS GENES <i>HHIP</i> , <i>PTCH1</i> , <i>SHH</i> E <i>VEGF-A</i>	39
5.4	PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA COMPARANDO PARÂMETROS CLÍNICOS E GRADAÇÃO HISTOLÓGICA	40
5.5	MDV	44
5.6	IHQ DE VEGF-A	46
5.7	CORRELAÇÃO E COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>SHH</i> E <i>VEGF-A</i> COM A MDV	49
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O Câncer de boca está entre os 12 tumores malignos mais comuns, sendo que o Carcinoma Escamocelular Oral (CECO) corresponde a mais de 90% dos casos diagnosticados (Parkin et al., 1985; Jemal et al., 2011). O principal fator de risco relacionado ao desenvolvimento do CECO é o uso do tabaco e o álcool parece ter ação sinérgica a dos carcinógenos químicos presentes no tabaco (Castellsagué et al., 2004; Rodriguez et al.; 2004; Kawakita et al., 2011).

A patogênese dos tumores malignos ainda é intensamente estudada por muitos grupos de pesquisas no mundo. Sabe-se, entretanto, que a transformação e a proliferação neoplásicas de células ou grupos de células, normalmente, envolve a desregulação de vias de sinalização que participam do desenvolvimento embrionário normal, dentre estas vias destaca-se o papel da via *Sonic Hedgehog* (SHH) (Taipale; Beachy, 2001; Altaba et al., 2002; Adolphe et al., 2004; Chari; McDonnell, 2007).

A via de sinalização SHH 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). Estudos já demonstraram que esta via tem importante papel na patogênese de tumores, como no câncer do trato gastrointestinal, de pâncreas e de próstata, especialmente por participar da ativação de programas relacionados a proliferação e sobrevivência celular e da manutenção e proliferação de células-tronco tumorais (Riobo et al., 2006; Chari; McDonnell, 2007).

A via SHH pode também participar da progressão tumoral, através do estímulo a angiogênese de neoplasias humanas (Olsen et al., 2004; Yamazaki et al., 2009), uma vez que o ligante da via, a proteína SHH, parece atuar através da modulação positiva na expressão de fatores angiogênicos ou na ativação de células endoteliais (CE) e células progenitoras endoteliais (CPE). Por sua vez, a proteína Hedgehog-interacting protein (HHIP), inibidor da via SHH, parece estar em menor quantidade em diversos tumores humanos, com consequente aumento da responsividade destas células a SHH e, consequentemente, um maior estímulo a angiogênese (Olsen et al., 2004).

A angiogênese, por sua vez, é um evento que contribui para a progressão tumoral, não somente por prover oxigênio e nutrientes às células malignas, mas também por favorecer a

uma possível rota de disseminação destas (Lejbkowitz et al., 2004 ; Swelam et al., 2005; Baeriswyl; Christofori, 2009). Entre os fatores angiogênicos, destaca-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o qual participa da proliferação e migração de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular e ainda pode atuar na degradação da matriz extracelular (Ferrara, 1996; Adams; Alitalo, 2007). Dentre as estratégias utilizadas para estudar a angiogênese tumoral, a caracterização da microdensidade vascular (MDV), através da imuno-histoquímica (IHQ), tem se mostrado um método cientificamente adequado, uma vez que diversos marcadores endoteliais estão disponíveis para utilização em tecidos parafinizados (Choi et al., 2005).

Este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil de expressão gênica de componentes da via de sinalização SHH (*SHH*, *PTCH1* e *HHIP*) que possam estar relacionados a angiogênese em CECO, bem como os níveis de expressão de *VEGF-A* e a microdensidade vascular nestes tumores, afim de melhor compreender a patogênese e comportamento desta neoplasia maligna

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma Escamocelular Oral (CECO)

O CECO é o sexto tumor mais frequente na população mundial (Hunter et al., 2005) e entre os países com maior incidência estão Paquistão, Brasil, Índia e França (Cancela et al., 2010). No Brasil, segundo os últimos dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) (Brasil, INCA, 2012), o CECO ocupa o 7º lugar entre as neoplasias malignas mais comuns em homens e o 9º lugar em mulheres. No ano de 2009, foram registradas 6.510 mortes por câncer de boca, desta forma o CECO constitui-se em um problema de saúde pública (Brasil, INCA, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2005), o CECO é uma neoplasia epitelial invasiva que ocorre predominantemente em adultos usuários de tabaco e álcool, especialmente entre a 5ª e 6ª décadas de vida. Clinicamente esta lesão pode se apresentar como uma placa eritematosa, um nódulo ou ainda como uma úlcera, podendo ou não estar associada a dor, dificuldade na deglutição, na fala e odor bucal. Os sítios da cavidade bucal mais acometidos pelo câncer de boca são: os dois terços anteriores da língua, assoalho bucal, palato duro, mucosa jugal, região retromolar e gengiva, nesta ordem (Lambert et al., 2011).

O Sistema TNM, desenvolvido por Pierre Denoix é adotado pela OMS para estadiamento clínico e, através deste é possível descrever a extensão anatômica da lesão com base em 3 componentes: T, a extensão do tumor primário; N, a ausência ou a presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais; e M, a ausência ou a presença de metástase a distância. De acordo com o TNM, os tumores são agrupados em estádios clínicos, que podem variar do estágio I ao IV. Nos estádios I e II as lesões não apresentam metástase em linfonodos regionais (N0), nem à distância (M0), são tumores T1 e T2, respectivamente. Os tumores T3 ou aqueles com um linfonodo regional invadido (N1) são considerados estágio III. A partir de lesões classificadas como T4, ou aquelas que apresentam 2 linfonodos regionais invadidos (N2) e todos os tumores que apresentam metástase à distância (M1), considera-se estágio IV (TNM, 2004).

Histologicamente, o CECO exibe um amplo espectro de alterações citológicas e arquiteturais, tais como pleomorfismo celular, nuclear e mitoses atípicas. A partir destas alterações, o tumor pode ser graduado histologicamente em três tipos: CECO bem

diferenciado, CECO moderadamente diferenciado ou CECO pobremente diferenciado. O grau histológico contribui para o prognóstico do paciente e quanto menos diferenciado o tumor pior o seu prognóstico (OMS, 2005).

O modelo de carcinogênese em múltiplas etapas é muito utilizado para descrever as alterações histológicas associadas ao desenvolvimento do CECO. O processo neoplásico inicia-se no epitélio oral normal que progride para uma lesão pré-maligna, denominada displasia epitelial oral (DEO), esta pode se transformar num carcinoma *in situ*, e finalmente evoluir para um carcinoma invasivo. Dessa forma, o diagnóstico precoce das DEOs pode representar a principal estratégia para a diminuição da incidência de CECO. As DEOs, podem se apresentar clinicamente como placas brancas ou vermelhas (Richard; Pillai, 2010) e, neste estágio, quando removido o estímulo oncogênico, o tecido pode retornar ao estado de homeostasia. Entretanto, acredita-se que 20% das DEOs progridam para um carcinoma invasivo (Reibel, 2003), como reflexo de alterações genéticas que resultam na ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores de tumor através de amplificação genética, metilação de promotor, deleção e mutação pontual (Perez-Ordonñez et al., 2006). A perda de expressão de moléculas de adesão celular e o aumento da secreção de fatores angiogênicos também são estímulos para a transformação maligna das DEOs (Pitiyage et al., 2009).

Um modelo de progressão genética em nível molecular foi proposto por Califano et al. (1996). Segundo estes autores, inicialmente, ocorre o aparecimento de uma lesão hiperplásica benigna devido a perda do cromossomo 9p. Em seguida esta lesão pode evoluir para uma displasia epitelial ocasionada pela perda dos cromossomos 3p e 17p. O desenvolvimento do carcinoma *in situ* pode ocorrer em razão da amplificação do *loci* genético 11q13 e perda dos cromossomos 11q e 14q. Ao final, o carcinoma invasivo desenvolve-se com a perda dos cromossomos 6p, 8 e 4q (Figura 1). Tais alterações genéticas incluem os genes supressores de tumor *p16* (9p21), *p53* (17p) e *retinoblastoma* (Rb) (13q) e o oncogene *ciclina D1* (11q13).

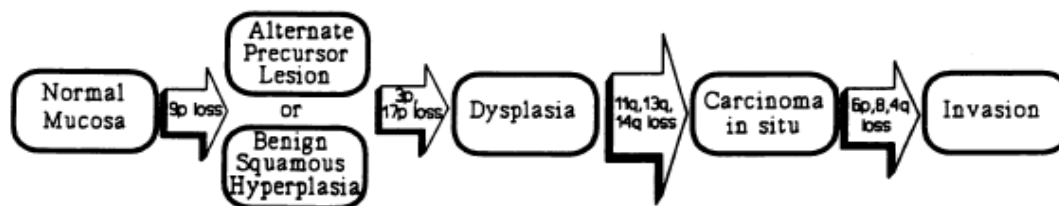


Figura 1. Modelo de progressão genética: mudanças genéticas associada com a progressão histopatológica do CEC de cabeça e pescoço baseada na perda de material cromossômico (perda de alelo). Fonte: Califano et al. (1996).

Diversos estudos epidemiológicos demonstram que o tabaco e o álcool, são os principais agentes carcinogênicos no desenvolvimento do câncer de boca, sendo estes fatores responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de CECO (Castellsagué et al., 2004, Rodriguez et al.; 2004; Kawakita et al., 2011). O restante dos pacientes acometidos por esta neoplasia, não relatam em seus históricos clínicos exposição ao tabaco e/ou álcool. Deficiências dietéticas, como de vitamina A, vitamina C, vitamina E, folato, entre outros elementos, são associadas a um aumento de risco para o desenvolvimento de CEC (Carcinoma escamocelular) de cabeça e pescoço (Pelucchi et al., 2003; Taghavi; Yazdi, 2007). Outros potenciais fatores de risco para esta neoplasia são espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio, diabetes e história de CEC de cabeça e pescoço na família (Bahar et al., 2007; Rasheed et al., 2007). Mais recentemente, muitos pesquisadores têm investigado uma possível associação entre a infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) e o risco para o desenvolvimento do CECO (Gillison; Shah, 2001; Herrero et al., 2003; Machado et al., 2010). Neste aspecto, Syrjänen et al. (1983) foram pioneiros em descrever pela primeira vez a possível ação carcinógena do HPV em CECOs.

A mutação do gene *p53* é a alteração genética mais observada no câncer humano, sendo associada ao consumo de tabaco e consequente desenvolvimento de CEC de cabeça e pescoço, assim como do câncer de esôfago, pulmão e mama (Harris; Hollstein, 1993). Segundo Brennan et al. (1995), a mutação mais comum do gene *p53* é a troca das bases nitrogenadas GC→AT, GC→TA e AT→GC. Associada a mutação do gene *p53*, outras alterações são comuns no CEC de cabeça e pescoço, como superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Kalyankrishna; Grandis, 2006) e de ciclina D1 (Callender et al., 1994), além de uma baixa expressão da proteína p16 e regulação positiva de Rb. Vale ressaltar, que tais características são observadas nos casos de CEC HPV-negativo, já os tumores HPV-positivos apresentam características moleculares distintas, como a proteína *p53* selvagem, baixa expressão de ciclina D1 e superexpressão de p16 (Gillespie et al., 2009).

O tratamento do CECO ainda está associado a uma alta morbidade e pode resultar em dificuldades na fala, distúrbios na deglutição e mastigação, deformidades cosméticas e problemas psicológicos. Ainda existe grande dificuldade de prever a história natural de lesões individuais, embora o prognóstico seja estabelecido a partir do tamanho do tumor, correlação com sítios anatómicos nobres, gradação histológica e envolvimento de linfonodos (Méndez et al., 2002). A sobrevivência ainda é baixa entre os pacientes acometidos pelo CECO. Aproximadamente 50-60% dos pacientes sobrevivem por 5 anos, após o diagnóstico, assim a identificação da doença precocemente, aliada a um tratamento eficiente representa a principal estratégia para melhorar o prognóstico do CECO (Jemal et al., 2006).

2.2 A via *Sonic Hedgehog* (SHH)

O funcionamento da via SHH foi inicialmente descrito em estudos com *Drosophila*, sendo grande parte dos seus componentes preservados em humanos (Goodrich et al., 1997; Hahn et al., 1999). Esta via está envolvida no desenvolvimento embrionário normal de órgãos, como dentes (Hardcastle et al., 2001), pulmões (Grindley et al., 1997), cólon, mama, esôfago (Inghan; McMahon, 2001), próstata, estômago (Chari; McDonnell, 2007), sistema nervoso (Wetmore, 2003) e pâncreas (Thayer et al., 2003).

Três proteínas homólogas são responsáveis pela ativação da via, são elas: *Sonic* (SHH), *Desert* (DHH) e *Indian* (IHH). A proteína SHH participa do desenvolvimento do sistema límbico, somitos e do tubo neural (Hardcastle et al., 1998; St-Jacques et al., 1998). Enquanto que a proteína IHH está envolvida no desenvolvimento de condrocitos, já a proteína DHH participa do desenvolvimento de células germinativas (Bitgood et al., 1996).

A ativação da via canônica ocorre pela interação do ligante SHH com o receptor transmembrânico *Patched 1* (PTCH1), o que libera a atividade inibitória normal de PTCH1 sobre *Smoothed* (SMO). Motoyama et al. (1998) demonstraram que outra proteína, denominada *Patched 2* (PTCH2), também estaria funcionando como receptor da via. No entanto, este receptor somente está expresso em tecidos nos quais a interação com DHH acarreta no desenvolvimento de células germinativas (Carpenter et al., 1998). Na ausência de interação com os ligantes da via, PTCH1 tem seu domínio de ativação de caspases induzindo a apoptose, através do estímulo da caspase 9 o que é mediado pela proteína adaptadora DRAL, durante a embriogênese (Mile et al., 2009).

Uma vez ativada a via canônica, SMO é fosforilado por receptores quinases acoplados a proteína G, GRK2 e CSNK1A1. A fosforilação de SMO torna esta proteína ativa, o que acarreta na sua internalização e posterior interação com o complexo repressor formado pelas proteínas: quinesina, uma proteína de ligação ao microtúbulo, *Supressor of Fused* (SUFU) e a serina/treonina quinase *Fused* (FU), além das proteínas *Glioma-associated oncogene* (Gli), as quais são os fatores de transcrição da via SHH (Chari; McDonnell, 2007). O ancoramento das proteínas Gli no citoplasma impede a exportação nuclear desta molécula e até mesmo pode mascarar o domínio sinalizador da mesma (Kogerman et al., 1999). A interação entre SMO e este complexo culmina na liberação dos fatores de transcrição Gli. Cabe ainda ressaltar que a proteína FU também funciona como regulador positivo da via SHH, uma vez que inibe a ubiquitinação de Gli (Takenaka et al., 2007). Além disso, Gli pode ser fosforilado pela proteína quinase A (PKA), o que subsequentemente torna este fator de transcrição marcado para degradação via proteassoma (Chari; McDonnell, 2007).

O gene *Glioma-associated oncogene homolog* (*GLI*) está localizado no locus 12q13.3-14.1 e codifica uma proteína de 118 KDa com 5 domínios repetidos de ligação ao DNA do tipo “dedos de zinco”. Este fator de transcrição faz parte da família de proteínas “dedos de zinco” *Gli-kruppel*. Esta família é formada por duas subclasses, Gli e Kruppel, as quais são classificadas de acordo com a sequência de aminoácidos terminal na região “dedo” e o espaço entre os resíduos de cisteína e histidina (Kinzler et al., 1988). As proteínas Gli são formadas por mais de mil aminoácidos, podendo ser observados três subtipos: Gli1, Gli2 e Gli3. Duas isoformas Gli, Gli2 e Gli3, são constitutivamente formadas, a ativação de SMO se opõe a atividade do complexo repressor sobre tais proteínas, culminando na transcrição de genes alvos, entre eles *Glioma-associated oncogene homolog* (*GLI1*) e *Patched homolog* (*PTCH1*) (Stone et al., 1999). Gli1 é um ativador transcricional, enquanto Gli3 exerce função de repressor. Já a proteína Gli2 pode exercer ambas as funções, de repressor e ativador de transcrição. O balanço entre as formas repressoras e ativadoras da proteína Gli é fundamental na resposta celular a ativação da via SHH, acarretando numa combinação de ativação e depressão de genes alvos da via (Ruiz; Altaba, 1994).

Outro componente fundamental da via SHH é o seu inibidor, a proteína HHIP a qual possui afinidade com todos os ligantes *hedgehog*, SHH, IHH e DHH, e sua interação com estes medeia a endocitose e degradação destas proteínas (Chari; McDonnell, 2007). O gene *hedgehog-interacting protein* (*HHIP*) é um dos alvos dos fatores de transcrição da via SHH e,

em alguns tumores, como carcinomas basocelulares, há uma superexpressão da proteína, provavelmente como uma tentativa de controlar a via SHH (Kato; Kato, 2005). Em outras neoplasias há uma perda de expressão de HHIP, como no câncer gástrico, reto, cólon e pulmão, o que pode favorecer a progressão tumoral (Olsen et al., 2004).

A atividade da via SHH resulta na ativação de genes alvos, envolvidos na regulação de *feedback* (*PTCH1*, *HHIP*, *GLI1*), proliferação celular (ciclina D1, B-catenina), sobrevivência (*Bcl-2*), manutenção de células-tronco teciduais (*WNT2B*, *WNT5A*, *BMP4*) e transição epitélio mesênquima (*ZEB1*, *ZEB2*) (Kato; Kato, 2009). Desse modo, a desregulação da via SHH durante o desenvolvimento embrionário ou na vida adulta acarreta em sérias consequências. A redução da atividade da via durante a embriogênese de mamíferos pode ocasionar, por exemplo, o aparecimento de holoprosencéfalia, caracterizada pelo defeito na separação do lobo cefálico associado a deformidades faciais (Goodrich; Scott, 1998). A Figura 2 demonstra esquematicamente o funcionamento da via SHH.

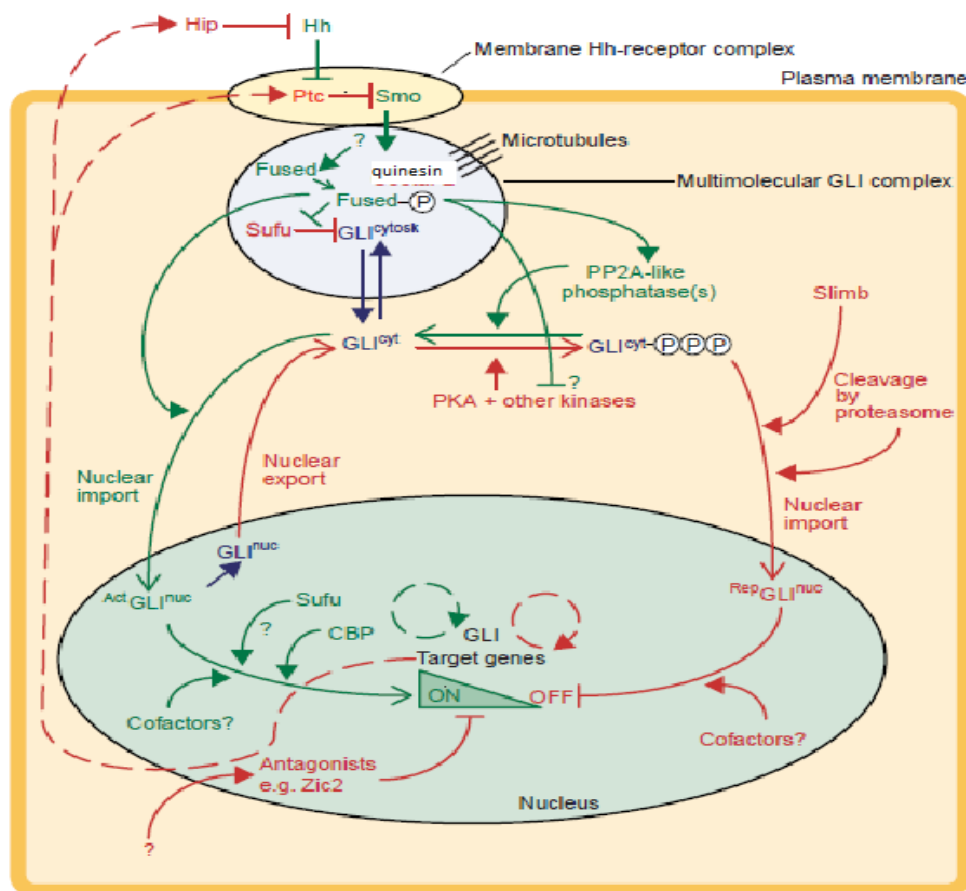


Figura 2. Demonstração esquemática do funcionamento da via SHH. Fonte: Altaba, 1999.

As primeiras evidências da participação da via SHH no desenvolvimento de tumores foi demonstrado em pacientes com Carcinomas Basocelulares (CBC) esporádicos e associados a Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide (SCBCN) (Gorlin, 1995; Hahn et al., 1999). Mutações no gene *PTCH1*, superexpressão de *Sonic Hedgehog homolog (SHH)* e ativação dos fatores de transcrição Gli estão envolvidos no surgimento destes tumores (Walterhouse et al., 1999).

Desde então estudos na literatura demonstram que a via SHH participa da patogênese de diversos tumores humanos, como câncer de próstata (Chari; McDonnell, 1997), estômago (Kato; Kato, 2005), sistema nervoso (Wetmore, 2003), pulmão (Bellusci et al., 1997; Grindley et al, 1997), cólon, mama, esôfago (Inghan; McMahon, 2001) e pâncreas (Thayer et al., 2003).

Sabendo-se que a via SHH está envolvida no desenvolvimento e progressão tumoral, atualmente investiga-se intensamente se o bloqueio desta via pode reduzir a proliferação das células tumorais e conseqüentemente a progressão do tumor. Recentemente, Yan et al. (2011) estudando a ação de inibidores da via SHH, Ciclopamida e GANT61, em linhagem de células de CECO demonstraram que o bloqueio da atividade da via SHH estava associado a uma inibição da proliferação celular e a um aumento da apoptose das células tumorais. A ciclopamida é um inibidor bem documentado o qual reduz a atividade da via SHH por funcionar como antagonista da proteína SMO (Figura3) (Taipale et al., 2000; Lord; Ashworth; 2010). Já o inibidor GANT61 tem ação sobre as proteínas Gli impedindo sua ligação ao DNA (Lauth et al., 2007).

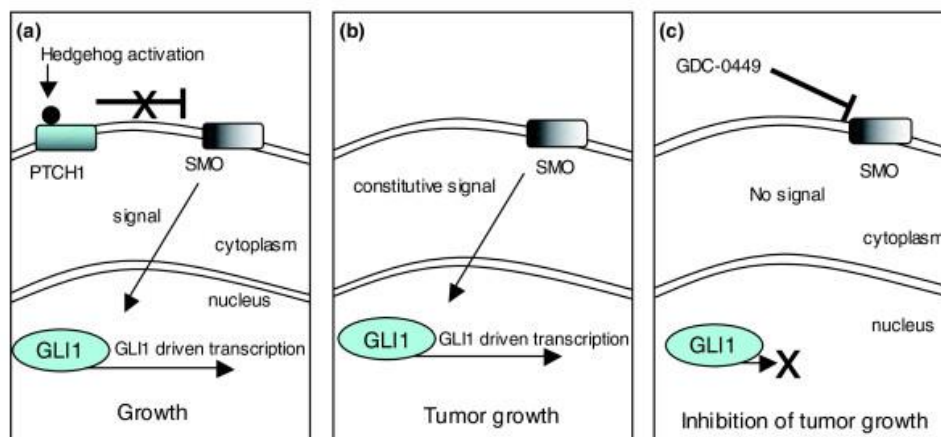


Figura 3. Representação da ação da ciclopamida (GDC0449) no bloqueio da via *hedgehog*. Fonte: Lord; Ashworth (2010).

2.3 Via SHH e angiogênese

A via SHH apresenta um importante papel na formação de novos vasos sanguíneos em tecidos embrionários (vasculogênese) e adultos (angiogênese). A primeira evidência de seu papel na vasculogênese foi demonstrada em um estudo conduzido em camundongos transgênicos que expressavam altos níveis do ligante SHH no tubo neural dorsal. Consequentemente, estes animais apresentavam uma hipervascularização da neuroectoderme (Rowitch et al., 1999).

Posteriormente, conforme demonstrado por Pola et al. (2001) em córneas de camundongos submetidas a isquemia e por Lee et al. (2007) em linhagem de fibroblastos, demonstrou-se o papel do ligante SHH no estímulo a neovascularização em tecidos adultos. Segundo estes autores o ligante da via estaria induzindo a angiogênese através da secreção de fatores angiogênicos, incluindo o VEGF e angiopoietinas, angiopoietina-1 (Ang-1) e angiopoietina-2 (Ang2), por células mesenquimais.

O mecanismo pelo qual a via SHH estimula a expressão de fatores angiogênicos por células mesenquimais ainda precisa ser determinado. Kusano et al. (2005) e Lavine et al. (2008), utilizando modelo de isquemia em miocárdio de camundongos, demonstraram que fibroblastos estimulados por SHH apresentaram um aumento da expressão de *GLII* e *PTCH1*. No entanto, segundo Pola et al. (2001) nenhum elemento responsivo a Gli1 está presente na região promotora do gene do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) e das angiopoietinas. Krishnan et al. (1997) identificaram um novo fator de transcrição que pode ser ativado pela via SHH, o denominado *Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors II* (COUP-TFII), membro da família de receptores nucleares órfãos. Sua expressão tem sido relacionada ao desenvolvimento embrionário de compartimentos estromais de diversos órgãos, como mama, rim e próstata (Pereira et al., 1995). Um trabalho conduzido em embriões deficientes em no gene *COUP-TFII*, demonstrou que estes embriões apresentavam defeito no desenvolvimento do plexo vascular primário e redução dos níveis de Ang-1 (Pereira et al., 1999). Em camundongos adultos com tumores mamários demonstrou-se que COUP-TF II é regulador positivo para Ang-1, além de contribuir para o desenvolvimento de metástases (Qin et al., 2010).

Asai et al. (2006), em um modelo experimental de cicatrização de ferida, demonstraram que a via SHH, além de estimular a secreção de fatores angiogênicos, também

pode estimular a angiogênese através da ativação de CPE derivadas da medula óssea. Yamazaki et al. (2008), estudando câncer de pâncreas, demonstraram que a via SHH poderia estar estimulando a neovascularização em tumores, tanto por induzir a secreção de fatores angiogênicos pelas células estromais, como também por estimular o recrutamento e proliferação de CPEs.

Segundo Olsen et al. (2004), as CEs expressam baixos níveis de PTCH1 e grandes quantidade de HHIP. No entanto, durante o processo de formação tubular estas células têm uma diminuição na expressão de HHIP e um aumento da expressão de PTCH1, tornando-se responsivas a SHH. O mesmo também estaria ocorrendo com tumores humanos nos quais observa-se uma redução dos níveis de HHIP em comparação ao tecido normal correspondente, sendo assim os tumores tornam-se mais resnponsivos a SHH.

Kanda et al. (2003), estudando a atividade da via SHH em cultura de CE de cordão umbilical (HUVEC), observaram que SHH é responsável por promover morfogênese capilar, porém não seria capaz de promover a migração ou proliferação destas células. Vale ressaltar que tal atividade ocorre dependente da atividade de SMO, porém SMO não estaria estimulando a ativação do fator de transcrição Gli. Esta foi a primeira evidência de que as CE são estimuladas pela via SHH, mas por um mecanismos independente de Gli.

Posteriormente, Chinchilla et al (2010), utilizando linhagem de células HUVEC, confirmaram que as CE respondem aos ligantes SHH por mecanismo independente de Gli (via não canônica) e apresentou dois modelos: um mediado por SMO e outro independente de SMO. A interação dos ligantes *Sonic* com a CE ativa a GTPase RhoA, num mecanismo dependente de SMO e da proteína heterodimérica Gi. A interação destas proteínas funciona de forma semelhante ao modelo clássico de receptor acoplado a proteína G, culminando na atividade de RhoA que ativa a molécula efetora Rho quinase (ROCK). A ativação da via RhoA-ROCK promove regulação da polaridade e migração celular através da reorganização do citoesqueleto de actina, além de induzir resposta transcricional mediada pelo fator de resposta sérico (SRF). O mecanismo independente de SMO é mediado pela interação de ligantes SHH com a proteína PTCH1 o que mantém a sobrevivência das CE, uma vez que previne a atividade apoptótica de PTCH1 que ocorre na ausência da interação com seus ligantes. O modelo descrito por Chinchilla et al. (2010) pode ser observado na Figura 4.

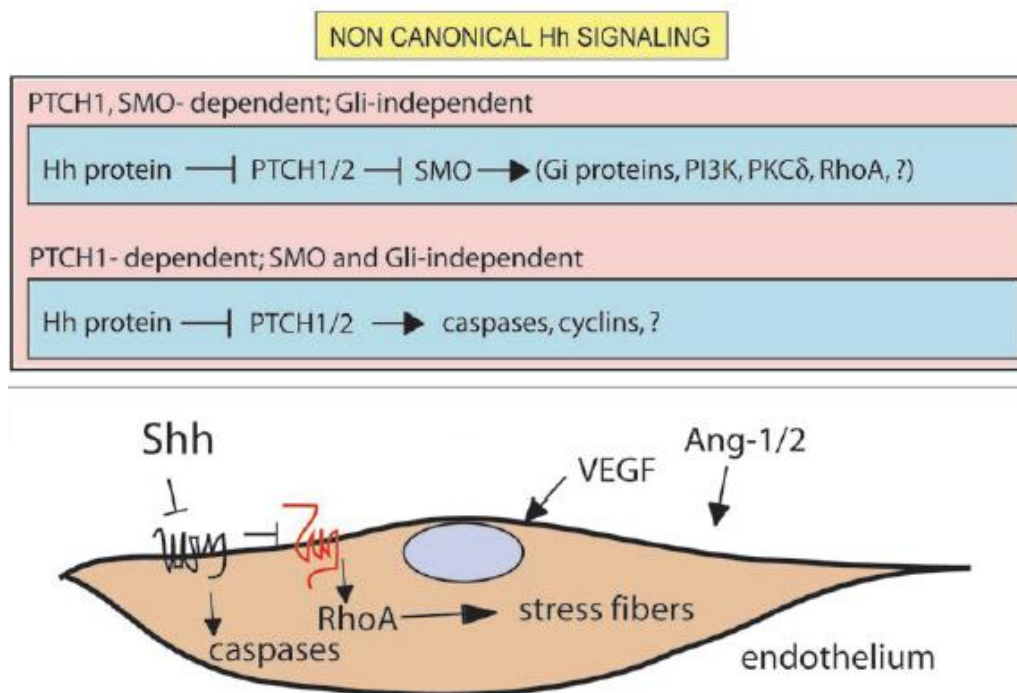


Figura 4. Modelo de ativação de CE pela via SHH independente de Gli (Via não canônica). Fonte: Adaptado de Chinchila et al. (2010).

Renault et al. (2010) demonstraram que a ativação da via SHH em CE, além de ativar a sinalização RhoA-ROCK, culmina no aumento da expressão de osteopontina (OPN) e metaloproteinase 9 (MMP-9). A osteopontina promove a migração e sobrevivência das CE, enquanto que a MMP-9 gera degradação do colágeno tipo IV da membrana basal e da matriz extracelular.

O conhecimento da atividade da via SHH no estímulo a angiogênese abriu portas para estudos que investigam o potencial terapêutico tanto do bloqueio da via para reduzir a neovascularização, quanto do seu estímulo para revascularização de tecidos. Kusano et al. (2005), usando camundongos, demonstraram que a terapia com SHH foi capaz de aumentar a angiogênese após isquemia aguda do miocárdio. Nakamura et al. (2010) usaram ciclopamida para bloquear a via SHH, em tumores xenográficos de adenocarcinoma pancreático implantados em camundongos e observaram uma redução da angiogênese tumoral.

A angiogênese é um processo coordenado que envolve degradação e remodelação da membrana basal, a proliferação, migração e associação de células endoteliais em estruturas tubulares e recrutamento de células perivasculares, incluindo fibroblastos e pericitos (Adams,

Alitalo, 2007). Sendo que a formação de novos vasos é um processo fundamental para progressão e capacidade de invasão tumoral (Lejbnkowitz et al., 2004). Judah Folkman formulou a hipótese de que a progressão tumoral depende da formação de vasos sanguíneos, a qual está associada ao equilíbrio entre fatores pro e anti angiogênicos (Bergers; Benjamin, 2003; Baeriswyl; Christofori, 2009), secretados por células neoplásicas e/ou inflamatórias adjacentes ao tumor (Raica et al., 2009).

O VEGF é o maior regulador positivo da angiogênese fisiológica e associada a processos patológicos, como as neoplasias. Neste grupo de moléculas, destaca-se o fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A), citocina que interage preferencialmente com os receptores do fator de crescimento endotelial vascular 1 (VEGFR-1) e 2 (VEGFR-2) (Baeriswyl;Christofori, 2009). Margaritescu et al. (2010) observaram uma maior expressão de VEGF-A em CECO, quando comparado a lesões pré-neoplásicas e tecido normal, demonstrando a importância desta molécula na progressão da angiogênese tumoral.

Dentre as estratégias utilizadas para estudar a angiogênese tumoral, a caracterização da MDV, através da imuno-histoquímica, tem se mostrado um método cientificamente adequado, uma vez que há disponíveis diversos marcadores endoteliais (Choi et al., 2005), sendo as glicoproteínas CD31 e CD34, as mais utilizadas para avaliar a MDV de tumores. A proteína CD31, além das células endoteliais de vasos de pequeno e grande calibre, em tecidos normais ou tumorais, também está presente em células hematopoiéticas (Akagi et al., 2002).

Além da contagem de vasos a avaliação da diferenciação das células endoteliais também é fundamental, pois terá valor na escolha de uma terapêutica adequada. Além disso, vasos pobremente diferenciados são mais facilmente acessados pelas células neoplásicas, aumentando o risco de metástases (Vermeulen et al., 2002). Entre os marcadores disponíveis, a molécula CD34, apesar de ser identificada em tecidos normais e neoplásicos, somente é encontrada em células endoteliais em proliferação (Kuzu et al., 1992).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil de expressão gênica de componentes da via de sinalização SHH (*SHH*, *PTCH1* e *HHIP*) que possam estar relacionados a angiogênese em CECO, bem como os níveis de expressão de *VEGF-A* e a MDV nestes tumores, afim de melhor compreender a patogênese e comportamento desta neoplasia maligna.

3.2 Objetivos Específicos/ Metas

- Analisar e correlacionar o perfil de expressão gênica de componentes da via SHH (*SHH*, *PTCH1* e *HHIP*) e *VEGF-A* em CECOs;
- Comparar o perfil de expressão dos genes *SHH*, *PTCH1*, *HHIP* e *VEGF-A* entre Mucosa não neoplásica adjacente ao tumor (MAT) e CECO;
- Associar o perfil de expressão gênica (*SHH*, *PTCH1*, *HHIP* e *VEGF-A*), a MDV e a imunomarcção de *VEGF-A* com os parâmetros clínicos e gradação histológica do CECO;
- Correlacionar e comparar o perfil de expressão gênica de *SHH* e *VEGF-A* com a MDV;

4 METODOLOGIA

4.1 Casuística

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM, FIOCRUZ, BAHIA), parecer 229/2010.

As amostras que foram incluídas na casuística deste estudo foram originadas do banco de tumores do Hospital do Câncer AC Camargo (São Paulo, SP), o qual faz parte da Rede Nacional de Biorepositórios, através de uma parceria científica do nosso grupo de pesquisas, com o grupo coordenado pelo Dr Fernando Soares. Para o estudo de expressão gênica foram utilizadas amostras criopreservadas de 50 casos de CECOs, 8 casos de MAT e 2 casos de mucosa oral não neoplásica de pacientes saudáveis (MNN). Para o estudo imuno-histoquímico foram utilizados blocos parafinizados de 56 amostras de CECO para confecção de lâminas de microararray. No total foram utilizados 66 casos de CECO, os quais foram caracterizados quanto a parâmetros clínicos e gradação histológica. Vale ressaltar que destas 66 amostras de tumores, 24 casos de CECO fizeram parte do estudo de expressão gênica e imuno-histoquímico

Todos os tumores foram diagnosticados e graduados segundo os critérios estabelecidos pela OMS (2005).

4.2 Confecção do *Tissue microarray* (TMA)

A partir de blocos parafinados foram construídas lâminas de TMA com auxílio de instrumento manual (Manual Tissue Arrayer 1, Beecher Instruments Microarray Technology™, Silver Spring, MI, USA). Áreas representativas de cada um dos tumores foram previamente selecionadas em lâminas de HE por um patologista experiente. As amostras foram mapeadas em uma única lâmina de TMA e, cada uma, apresentava 2mm de diâmetro e 4 µm de profundidade.

4.3 Imuno-histoquímica (IHQ)

Inicialmente os cortes foram desparafinizados e re-hidratados para realização da IHQ. A recuperação antigênica, assim como o clone e a diluição, para os anticorpos CD34 (Dako, Carpinteria, USA) e VEGF-A (Dako, Carpinteria, USA) podem ser observados na Tabela 1.

Para bloqueio da peroxidase endógena, foi utilizado peróxido de hidrogênio 3% por 15 minutos, em câmera escura. O bloqueio de proteínas teciduais foi efetuado utilizando uma solução específica para este fim, em temperatura ambiente por 10 minutos (Protein Blocking Solution™, Dako, Carpinteria, USA)

Tabela 1. Dados dos clones dos anticorpos, recuperação antigênica e diluição. Salvador, Bahia, 2011.

Anticorpos	Clone	Recuperação Antigênica	Diluição
CD34	QBEnd	Citrato pH 6,0	1:50
VEGF-A	VG1	Tris/EDTA pH 9,0	1:100

Os anticorpos primários foram incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Após lavagem com solução salina fosfatada PBS, os cortes foram incubados com o sistema polimérico de amplificação EnVision Advanced™ (Dako, Carpinteria, USA), por 20 minutos com o reagente *link* e 20 minutos com a enzima. Para revelação utilizou-se 3,3-diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, USA) por 5 minutos, em câmera escura. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, desidratados com etanol e diafanizados em xilol, para então proceder a montagem das lâminas em *permount*.

Todas as reações imuno-histoquímicas foram efetuadas em duplicata. Cortes de placenta e glândula salivar serviram de controle positivo para os anticorpos CD34 e VEGF-A, respectivamente.

4.4 Análise IHQ

As lâminas foram escaneadas em um microscópio digital virtual (Olympus Corporation, Tóquio, Japão) e exibidas em um monitor LCD com o auxílio do programa Olyvia™ Olympus Software (Olympus Corporation, Tóquio, Japão).

Para análise do anticorpo VEGF-A foi utilizado o método de escore de Sinicrope et al (1995), o qual avalia intensidade de marcação e proporção de células imunomarcadas. Quanto a intensidade, a marcação pode ser classificada segundo os seguintes escores: 1, fraca; 2, moderada; 3, forte. Considerando-se a proporção de células positivas em relação ao total de células, os escores e as seguintes porcentagens de células imunomarcadas podem ser: 0, <5%; 1, 5-25%; 2, 25-50%; 3, 50-75%; 4, >75%. Os escores da intensidade da marcação e da

proporção de células positivas são multiplicados obtendo-se um escore imunohistoquímico (EI) para cada caso. Este EI foi calculado para o parênquima e para o estroma tumoral, separadamente. Também se observou a localização da imunomarcação, se ocorria no citoplasma ou na membrana.

A imunomarcação para a proteína CD34 serviu para avaliação da microdensidade vascular (MDV). Neste caso, foram selecionadas de 3 a 5 áreas de maior vascularização (*hot spots*) de cada uma das amostras, em menor aumento (100X). Para a contagem dos microvasos individuais, as áreas previamente selecionadas foram exibidas em um monitor, em um aumento correspondente a magnificação de 200X. Foram considerados positivos, qualquer vaso sanguíneo que apresentasse luz e coloração acastanhada. Em seguida, as imagens foram importadas para o *Image Pro Plus*TM 5.0 software (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD), o qual foi previamente calibrado considerando-se os padrões de escaneamento utilizados pelo microscópio digital virtual (Olympus Corporation, Tóquio, Japão). Neste software (*Image Pro Plus*TM 5.0), as áreas de *hot spots* em aumento de 200x foram medidas e os vasos de cada uma das áreas contados, sendo que o resultado final foi dado em número de vasos/mm² (Valkovic et al., 2002).

4.5 Estudo da expressão gênica

4.5.1 Isolamento de RNA total e transcrição reversa (RT-PCR)

Para isolamento do RNA total, as amostras de tecidos congelados foram pulverizadas em nitrogênio líquido e procedeu-se a extração utilizando-se o reagente Trizol (InvitrogenTM, Carlsbad, CA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi armazenado com água livre de RNase em freezer -80°C.

Todo RNA extraído das amostras foi tratado com DNase I Amplification GradeTM (InvitrogenTM, Carlsbad, Califórnia, USA) por 30 min, a 37°C para eliminação de DNA genômico contaminante. A qualidade e pureza do RNA foi avaliada utilizando o aparelho Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies WaldbronnTM, GE), usando o RNA 600 Nanolab Chip Kit (Agilent Technologies WaldbronnTM, GE).

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1 µg de RNA total utilizando High-Capacity cDNA Reverse-Transcription Kit (Applied BiosystemsTM, Foster

City, CA), de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram incubadas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 segundos. O cDNA foi estocado a temperatura de -20°C. A eficiência da transcrição reversa foi avaliada pela amplificação do gene β -actina, por PCR convencional.

4.5.2 Reações de PCR em tempo real - qPCR

Para as reações de qPCR foram utilizados TaqMan Gene Expression Assays™ inventoriados para os genes *SHH* (Hs00179843_m1), *PTCH1* (Hs00181117_m1), *HHIP* (Hs01011015_m1) e *VEGF-A* (00900055_m1), assim como para os genes referências *GAPDH* (Hs02758991_g1) e *18S* (Hs03003631_g1). As reações foram conduzidas no aparelho ABI Prism 7900 (Applied Biosystems™, Foster City, CA), utilizando placa de 96 poços e com um volume total de 20 μ L. Cada um dos poços continha: 2,5ng/ μ L de cDNA da amostra (4 μ L), 1 μ L de Assay (Applied Biosystems™, Foster City, CA), 10 μ L de Taqman PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA) e 5 μ L de água livre de RNase. O programa de amplificação consistiu de um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Conforme ressaltado anteriormente, para o qPCR foram utilizados 50 casos de CECO, 8 casos de MAT e 2 casos MNN. Sabendo que o calibrador das reações de qPCR deve ser uma amostra que expresse todos os genes investigados no estudo de expressão gênica, investigamos e detectamos a expressão de todos os genes em 5 casos de MAT, três casos de MAT não apresentaram expressão de SHH. Desse modo, dos 8 casos disponíveis, os 5 casos de MAT que apresentaram expressão de HHIP, SHH, PTCH1 e VEGF-A foram agrupados em um *pool* (N2) o qual foi utilizado como calibrador das reações.

4.6 Análise da expressão gênica

Após as corridas de amplificação e dissociação, os valores de *Quantification Cycles* (Cqs) foram obtidos com o auxílio do Programa Operacional 7900™*System SDS* (Applied Biosystems, USA).

Para quantificação relativa foi utilizado o método comparativo de Cq ($\Delta\Delta CQ$) (Livak, Schmittgen, 2001). O valor de Cq de cada amostra foi normalizado utilizando a média

geométrica dos valores de Cq dos genes referências, *GAPDH* e *18S* (Vandesompele et al., 2002; Huggett et al., 2005). O calibrador selecionado para proceder ao cálculo matemático foi o *pool* N2. A fórmula matemática está descrita abaixo:

$$\left. \begin{array}{l} \Delta\text{CQ}_{\text{alvo}} = \text{Cq}_{\text{alvo}} - \text{Cq}_{\text{referência}} \\ \text{calibrador} = \text{Cq}_{\text{calibrador}} - \text{Cq}_{\text{referência}} \end{array} \right\} \Delta\Delta\text{CQ} = \Delta\text{CQ}_{\text{alvo}} - \Delta\text{CQ}_{\text{calibrador}} \left. \right\} 2^{-\Delta\Delta\text{CQ}} \Delta\text{CQ}$$

4. 7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram compilados em um banco de dados organizado em planilhas do programa operacional Microsoft Excel e a análise estatística foi realizada no *software* GraphPad prism 5.0.

Os dados da expressão gênica, MDV e EI foram avaliados quanto a normalidade através de análise descritiva (Média, Mediana, Curtose e Variância) e do teste de Shapiro-Wilk. Quando os resultados apresentavam distribuição não Gaussiano foram realizados teste não paramétricos e quando os dados apresentavam distribuição simétrica foram efetuados testes paramétricos.

As amostras foram comparadas utilizando os seguintes testes estatísticos:

- Teste de Mann Whitney e Teste T não-pareado: foi utilizado para comparar dois grupos independentes.
- Teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn : foi efetuado para comparar 3 ou mais grupos.
- Teste de correlação de Spearman: foi utilizado para correlacionar dois grupos.

O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os testes estatísticos efetuados.

5. RESULTADOS

5.1 Dados Clínicos e histológicos

Neste trabalho, foram utilizados 66 casos de pacientes com CECO primário, sendo 41 destes do sexo masculino (62%) e 25 do sexo feminino (38%). A idade dos pacientes variou entre 26 e 92 anos, com média de 62.3 (DP=14.01) anos. Vinte e seis tumores estavam localizados (39%) em língua, 9 (14%) em assoalho bucal, 8 em região retromolar (12%), 8 em gengiva (12%), 8 em mucosa jugal (12%), 5 em palato (8%) e 2 lesões não tiveram a localização determinada (3%).

Infiltração perineural foi descrita em 35 pacientes (54%), sendo que este dado estava indisponível para 3 (4%) indivíduos. Para a maioria dos CECOs (54;82%) não foi observada invasão vascular, enquanto que este aspecto estava presente em 10 (15%) casos. Dois (4%) CECOs não continham esta informação.

Os tumores foram classificados clinicamente de acordo com *TNM Classification of Malignant Tumours* (2002). Dos casos que formaram esta casuística, considerando a extensão do tumor primário, 43 (65%) tumores foram considerados como T1-T2, enquanto que 22 (33%) tumores foram classificados como T3-T4, vale ressaltar que para um (2%) caso de CECO este dado não estava descrito. Considerando-se a presença ou ausência e a extensão de metástase em linfonodos regionais, 26 (39%) lesões foram classificadas como N1-N3, 32 (49%) CECOs estavam no grupo N0, 6 (9%) casos não apresentaram invasão de linfonodo regional (Nx) e para 2 (3%) casos não foi possível obter tal informação. Quanto ao estágio clínico 38 (57%) casos foram considerados de estágio III-IV e 28 (43%) casos de estágio I-II.

De acordo com a classificação da OMS para tumores de cabeça e pescoço (2005), 43 CECOs (65%) foram classificados histologicamente como bem diferenciados, 19 (29%) como moderadamente diferenciados, 2 (3%) casos como pouco diferenciado e 2 (3%) casos não tiveram a gradação histológica determinada. Os dois casos de CECO pouco diferenciado foram excluídos da análise estatística, já que para efetuar testes estatísticos é preciso ter 3 amostras por grupo. Os dados da casuística estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Características clínico-patológicas dos pacientes com CECO primário. Salvador. Bahia. 2011.

Parâmetros clínicos	Total (n)	%
<u>Sexo</u>		
Homem	41	62
Mulher	25	38
<u>Tamanho</u>		
T1-T2	43	65
T3-T4	22	33
Não informado	1	2
<u>Estádio clínico</u>		
I-II	28	43
III-IV	38	57
<u>Linfonodo</u>		
N0	32	49
N1-N3	26	39
Nx	6	9
Não informado	2	3
<u>Infiltração perineural</u>		
Sim	35	54
Não	28	42
Não informado	3	4
<u>Invasão vascular</u>		
Sim	10	15
Não	54	82
Não informado	2	3
<u>Gradação Histológica</u>		
Bem diferenciado	43	65
Moderadamente	19	29
Pouco diferenciado	2	3
Não informado	2	3
<u>Local</u>		
Língua	26	39
Assoalho bucal	9	14
Região retromolar	8	12
Gengiva	8	12
Mucosa Jugal	8	12
Palato	5	8
Não informado	2	3

5.2 Perfil de expressão gênica de *HHIP*, *PTCH1*, *SHH* e *VEGF-A*

Os casos de MNN foram avaliados quanto a expressão dos genes *HHIP*, *PTCH1*, *SHH* e *VEGF-A*. Nenhum transcrito dos genes *HHIP* e *SHH* foi detectado nestas mucosas. Em um dos casos deste grupo, foi detectado expressão de *PTCH1* (0.11). As duas mucosas expressaram *VEGF-A*, com expressão relativa de 0.08 e 1.44.

Dos 50 casos de CECO, 41 (82%) expressaram o gene *HHIP*, sendo observada uma mediana de expressão de 0.067 (DP=10.64). Expressão de *HHIP* também foi observada em 8 casos de MAT, com mediana de expressão de 0.08 (DP=1.293). A expressão de *HHIP* foi maior em carcinoma oral do que em mucosa próxima ao tumor, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0.251$; Teste de Mann Whitney. Figura 5).

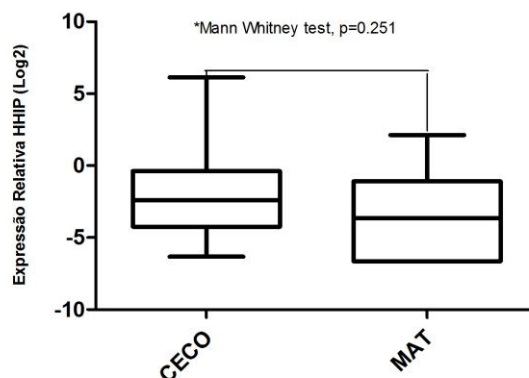


Figura 5. Comparação da expressão relativa de *HHIP* entre CECOs e MAT. Salvador, Bahia, 2011.

Expressão de *PTCH1* ocorreu em todos os casos de CECO, assim como em todas as amostras de MAT, sendo a mediana de expressão de 0.227 (DP= 7.370) e 0.45 (DP= 9.120), respectivamente. Não foi possível observar associação estatisticamente significativa ($p= 0.173$. Teste de Mann Whitney. Figura 6), quando comparada a expressão de *PTCH1* entre tumores e mucosa.

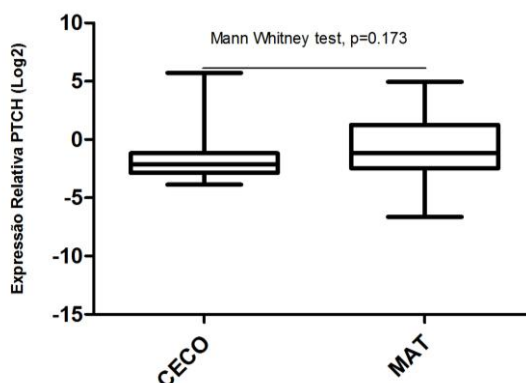


Figura 6. Comparação da expressão relativa de *PTCH 1* entre CECOs e MAT. Salvador, Bahia, 2011.

Dezessete (34%) casos de CECO não apresentaram expressão de *SHH*, os outros 33 (66%) tumores expressaram tal gene com uma mediana de expressão de 0.048 (DP= 3.608). Das 8 amostras de tecido não neoplásico, 37% (n=3) não expressou *SHH*. Foi possível verificar expressão deste gene em 5 (73%) MATs, com mediana de expressão de 0.02 (DP=0.804). A expressão de *SHH* foi maior em carcinoma quando comparado com a expressão em tecido normal, mas esta diferença não foi significativa ($p=0.32$; Teste de Mann Whitney. Figura 7).

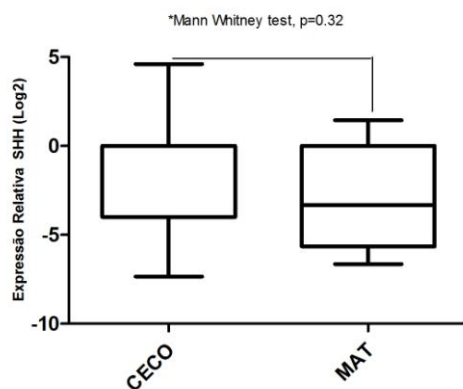


Figura 7. Comparação da expressão relativa de *SHH* entre CECOs e MAT. Salvador, Bahia, 2011.

Todos os tumores expressaram o gene *VEGF-A* e a mediana de expressão observada foi de 1.783 (DP= 7.437), assim como todos os casos de MAT também expressaram este gene, sendo a mediana de expressão de 21.73 (DP=34.12). O gene *VEGF-A* apresentou maior expressão em tecido não neoplásico do que em tecido tumoral ($p=0.034$. Teste de Mann Whitney. Figura 8).

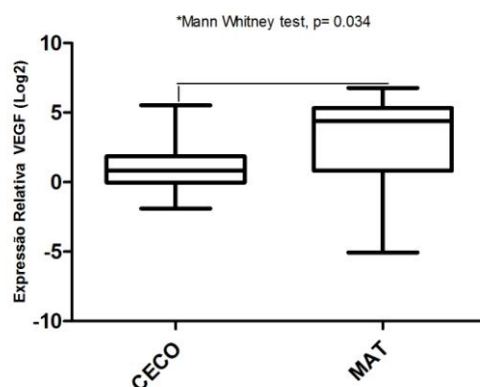


Figura 8. Comparação da expressão relativa de *VEGF-A* entre CECOs e MAT. Salvador, Bahia, 2011.

O perfil de expressão dos genes *HHIP*, *PTCH1*, *SHH* e *VEGF-A* em CECO e MAT pode ser observado nas figuras 9 e 10, respectivamente.

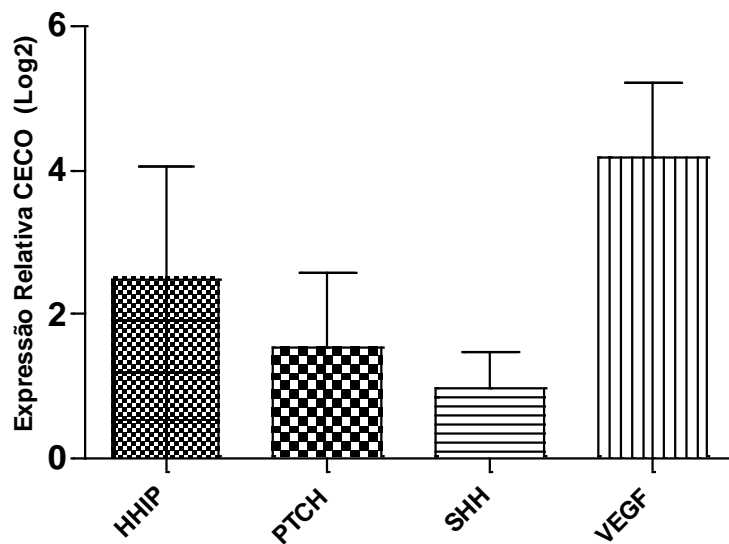


Figura 9. Perfil de expressão dos genes *HHIP*, *PTCH1*, *SHH* e *VEGF-A* em CECO. Salvador, Bahia, 2011.

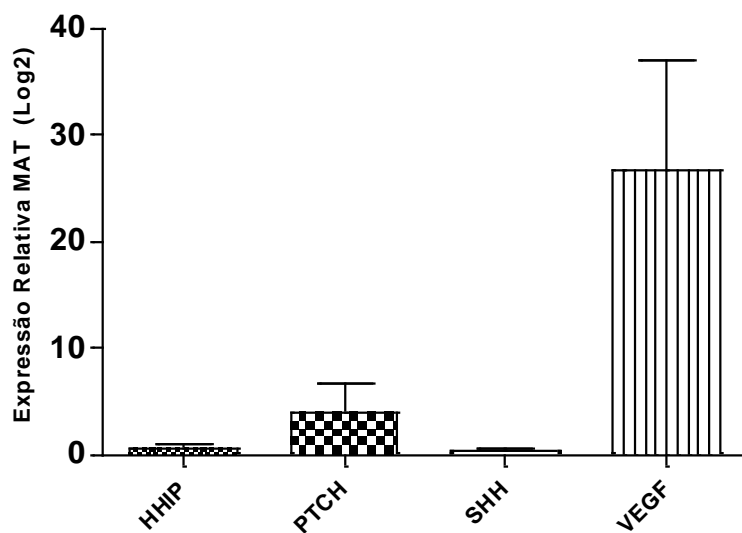


Figura 10. Perfil de expressão dos genes *HHIP*, *PTCH1*, *SHH* e *VEGF -A* em MAT. Salvador, Bahia, 2011.

5.3 Correlação entre os genes *HHIP*, *SHH*, *PTCH1* e *VEGF-A*

Para avaliar a correlação entre os níveis de expressão gênica de *HHIP*, *PTCH1*, *SHH* e *VEGF-A*, em CECO, utilizou-se o teste de correlação de Spearman. Correlação positiva regular foi observada para *SHH* e *HHIP* ($r_s=0.44$; $p=0.0014$. Figura 11), *SHH* e *PTCH1* (0.49 ; $p=0.0003$. Figura 12) e *SHH* e *VEGF-A* ($r_s=0.37$; $p=0.0086$. Figura 13), sendo estas correlações estatisticamente significantes. As demais correlações entre os genes estudados podem ser verificadas na Tabela 3.

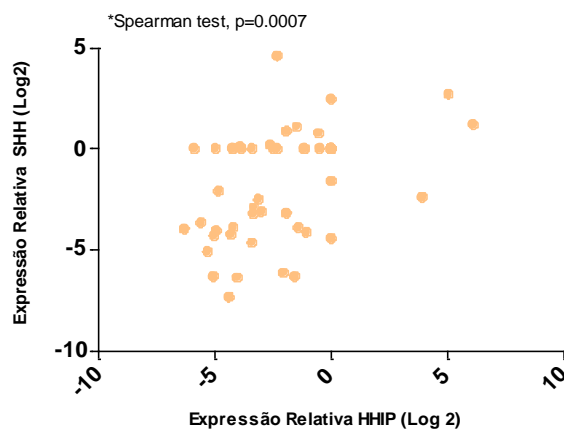


Figura11. Correlação entre *SHH* e *HHIP* em CECOs. .Salvador , Bahia, 2011.

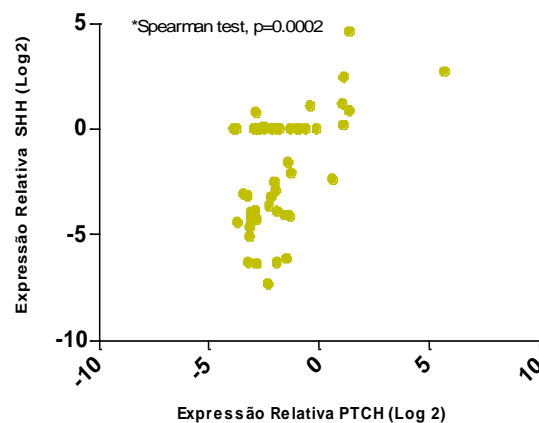


Figura 12. Correlação entre *SHH* e *PTCH1* em CECOs. .Salvador , Bahia, 2011.

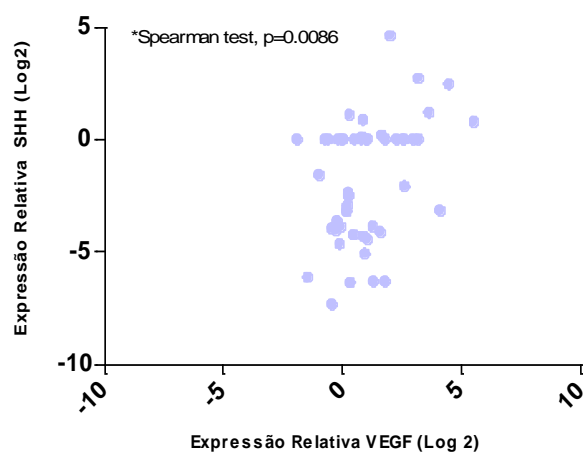


Figura 13. Correlação entre *SHH* e *VEGF-A* em CECOs. .Salvador , Bahia, 2011.

Tabela 3. Correlações entre os genes SHH, PTCH, HHIP e VEGF. Salvador. Bahia. 2011.

<i>Correlações</i>	<i>Coeficiente de Spearman (rs)</i>	<i>p</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
<i>HHIP e PTCH1</i>	0.29	0.044	-0.0043 a 0.5287
<i>HHIP e SHH</i>	0.44	0.0007	0.175 a 0.644
<i>HHIP e VEGF-A</i>	0.07	0.65	-0.224 a 0.3454
<i>PTCH1 e SHH</i>	0.49	0.0002	0.235 a 0.68
<i>PTCH1 e VEGF-A</i>	0.21	0.13	-0.788 a 0.4698
<i>VEGF-A e SHH</i>	0.37	0.0086	0.0916 a 0.5916

5.4 Perfil de expressão gênica, dados clínicos e gradação histológica

O perfil de expressão gênica dos genes avaliados foi comparado com os parâmetros clínicos e gradação histológica e os resultados podem ser melhor visualizados na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação da expressão gênica entre os diferentes parâmetros clínicos e gradação histológica. Salvador, Bahia, 2011.

Parâmetros	<i>HHIP</i>				<i>PTCH1</i>			<i>SHH</i>			<i>VEGF-A</i>		
	Total	Mediana	DP	p (valor)	Mediana	DP	p (valor)	Mediana	DP	p (valor)	Mediana	DP	p (valor)
Sexo													
Femino	18	0,08	2,826		0,19	3,29		0,07	0,63		1,82	5,95	
Masculino	32	0,06	8,376	0,198	0,25	12,27	0,317	0,02	1,566	0,38	1,75	10,980	0,507
Tamanho													
T1-T2	34	0,063	5,68		0,225	8,935		0,021	1,2		1,50	2,37	
T3-T4	15	0,069	17,94	0,625	0,267	0,867	0,777	0,067	6,28	0,41	3,48	12,31	0.0067^a
Estádio clínico													
I -II	22	0,09	3,23		0,189	0,695		0,438	0,832		1,22	1,32	
III- IV	28	0,081	14,33	0,15	0,263	9,828	0,44	1,394	4,611	0,96	2,25	9,49	0.0047^a
Linfonodo													
N0	19	0,047	0,15		0,179	0,163		0,012	0,796		1,03	3,89	
N1-N3	23	0,094	15,76	0,335	0,267	10,83	0,066	0,039	5,036	0,532	1,98	5,08	0.019^a
Infiltração perineural													
Sim	24	0,096	15,57		0,335	10,58	0.024	0,058	1,737		2,03	5,504	
Não	24	0,067	0,19	0,991	0,168	0,512		0,034	4,953	0,62	1,32	8,897	0,092
Invasão vascular													
Sim	9	11,580	24,36		0,933	17,14		0,079	7,934		4,04	6,610	
Não	40	0,512	2,39	0,091 ^a	0,228	0,532	0,155	0,021	0,534	0,413	1,58	7,470	0,056
Gradação Histológica													
Bem diferenciado	28	0,056	6,25		0,243	9,848		0,003	1,313		1,58	8,531	
Moderadamente	19	0,114	16,13	0,355	0,226	0,988	0,93	0,107	5,6	0.0015	2,43	5,762	0,233
Local													
Língua	22	0,106	15,1		0,589	0,667		0,06	5,170		1,15	3,069	
Palato	5	0,066	0,28		0,138	0,923		1,06	0,76	0.034	3,13	19,78	
Assoalho bucal	7	0,047	0,18		0,201	0,154		0,01	0,017		1,81	3,057	
Região retromolar	5	0,052	14,83	0,766	0,405	23,13	0,187	0,12	3,314		5,90	8,501	0,315
gingiva	5	0,06	0,04		0,155	0,074		0	0,020		1,98	0,378	
Mucosa Jugal	4	0,157	0,13		0,124	1,231		0,09	0,877		2,18	7,651	

^a Dados analisados pelo teste T não pareado

Uma maior expressão de *VEGF-A* foi observada em CECOs de maior tamanho, agrupados em T3-T4, em relação as lesões de menor tamanho, agrupadas em T1-T2, sendo esta associação estatisticamente significativa ($p=0.0067$; Teste T não pareado; Figura 14). O gene *VEGF-A* apresentou maior expressão em casos com pior prognóstico, agrupados como estágio III-IV, em relação ao grupo de tumores de melhor prognóstico, estágio I-II, observando-se diferença estatisticamente significativa ($p=0.047$; Teste T não pareado. Figura 15). Quanto à invasão de linfonodos regionais, os casos classificados como N1-N3 apresentaram maiores níveis de expressão gênica de *VEGF-A* em relação ao grupo N0, exibindo uma associação estatisticamente significativa ($p=0.019$. Teste T não pareado. Figura 16). Apesar de está mais expresso em casos de CECO com invasão vascular em relação aos carcinomas sem invasão vascular, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0.056$; Teste de Mann Whitney. Figura 17).

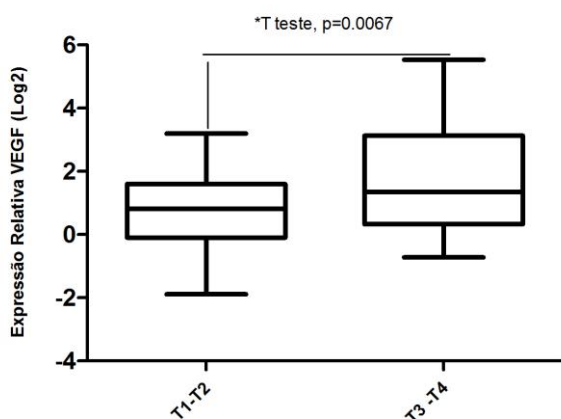


Figura 14. Comparação da expressão de *VEGF-A* entre CECOs classificados como T1-T2 e T3-T4. .Salvador , Bahia, 2011.

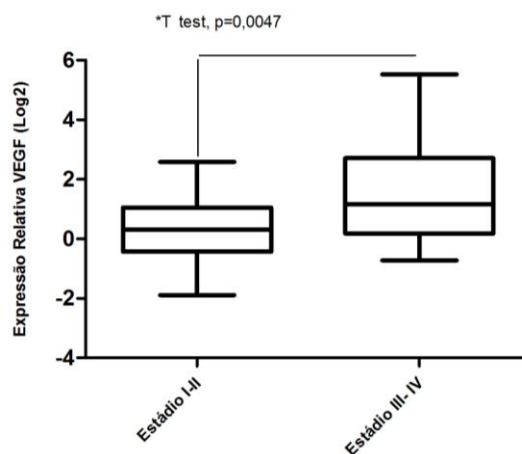


Figura 15. Comparação da expressão de *VEGF-A* entre CECOs estágio I-II e III-IV. .Salvador , Bahia, 2011.

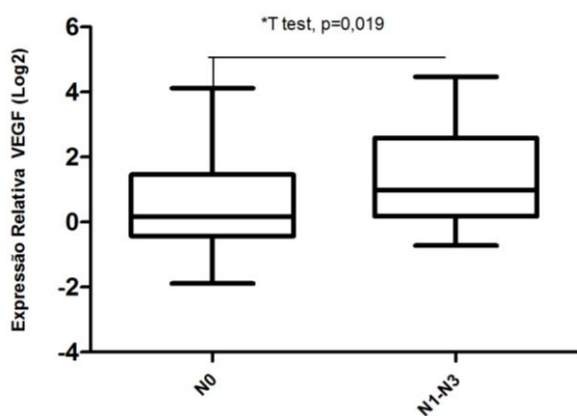


Figura 16. Comparação da expressão de *VEGF-A* entre CECOs N0 e N1-N3. .Salvador , Bahia, 2011.

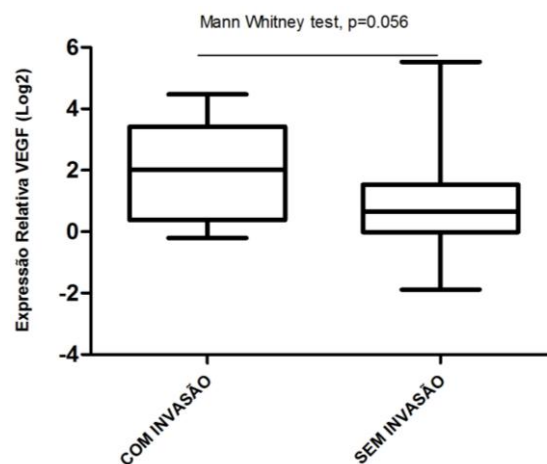


Figura 17. Comparação da expressão de *VEGF-A* entre CECOs com e sem invasão vascular. .Salvador , Bahia, 2011.

Quanto aos genes da via SHH, foi observada uma maior expressão de *PTCH1* em tumores com infiltração perineural quando comparado a tumores sem infiltração, sendo esta associação estatisticamente significativa ($p=0.024$; Teste de Mann Whitney. Figura 18). Carcinomas moderadamente diferenciados apresentaram maiores níveis do transcrito do gene *SHH* do que CECOs bem diferenciados, vale ressaltar que esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0.0015$; Teste de Mann Whitney. Figura 19). Ao comparar a expressão gênica de *SHH* entre as diferentes localizações, uma associação estatisticamente significativa foi observada ($p=0.034$; Teste de Kruskal-Wallis. Figura 20), no entanto o pós-teste de *Dunn* não demonstrou nenhuma diferença quando as diferentes localizações foram comparadas entre si.

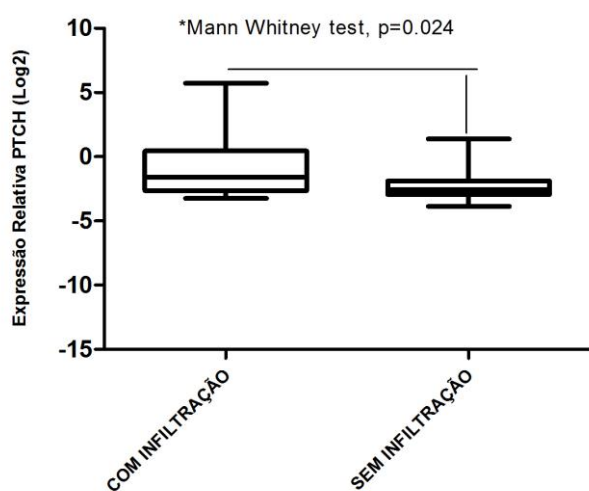


Figura 18. Comparação da expressão de *PTCH1* entre com e sem infiltração perineural. Salvador, Bahia, 2011.

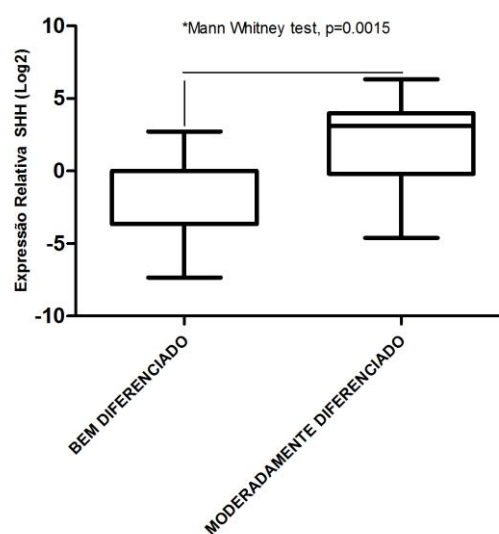


Figura 19. Comparação da expressão de *SHH* entre CECOs bem e moderadamente diferenciados. Salvador, Bahia, 2011.

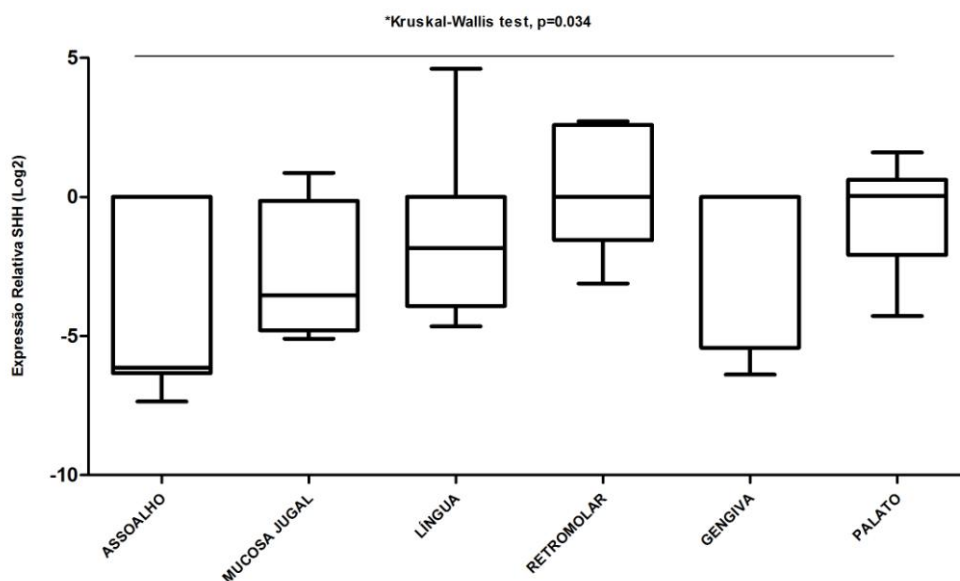


Figura 20. Comparação da expressão de *SHH* entre CECOs em diferentes localidades. Salvador, Bahia, 2011.

5.5 MDV

Dos 56 casos de CECOs disponíveis no TMA, 45 (80%) foram positivos para CD34, o restante dos *spots* foram excluídos da análise, por não apresentarem qualidade tecidual que permitisse a avaliação, como extensas áreas de perda de tecido, artefatos de corte, dobramento tecidual. Excluímos ainda quatorze (31%) CECOs positivos para CD34 que não atenderam ao critério mínimo de 3 áreas de *hot spots* para serem avaliadas. Dessa forma, dos 56 casos de CECO existentes no TMA, avaliamos a MDV em 31 (69%) tumores. A área analisada nos tumores variou de 1.32 mm² a 5.27 mm² (DP=1.039). A mediana de MDV foi de 21.73 vasos/mm² (DP=12.69). Quando a MDV foi comparada, considerando-se os diferentes parâmetros clínicos e gradações histológicas, não foi possível observar associações estatisticamente significantes. Os dados estão descritos na tabela 5. A figura 21 mostra a imunomarcagem de CD34 em CECO.

Tabela 5. Comparação da MDV entre os diferentes parâmetros clínicos e gradação histológica. Salvador, Bahia, 2011.

Parâmetros	MDV			
	Total	Mediana	DP	p (valor)
Sexo				
Femino	11	29.41	11.39	0.16
Masculino	20	17.73	13.29	
Tamanho				
T1-T2	20	17.73	13.1	0.28
T3-T4	10	31.98	11.45	
Estádio clínico				
I-II	12	17.35	14.6	0.28
III-IV	19	25.72	11.57	
Linfonodo				
N0	12	19.84	15.62	0.90
N1-N3	15	21.7	10.82	
Infiltração perineural				
Sim	10	32.27	12.95	0.14
Não	20	17.73	12.36	
Invasão vascular				
Sim	4	16.1	3.259	0.13
Não	26	24.78	13.18	
Gradação Histológica				
Bem diferenciado	19	21.73	11.5	0.79
Moderadamente	12	23.71	11.21	
Local				
Língua	13	21.7	12.62	0.82
Palato	3	26.31	14.15	
Assoalho bucal	3	17.94	5.942	0.82
Região retromolar	2	37.51	30.81	
Gengiva	3	16.76	8.625	0.82
Mucosa Jugal	6	31.98	11.51	

5.6 IHQ de VEGF-A

Para o VEGF-A, foi possível avaliar 41 (71%) casos de CECO, entre os 56 disponíveis no TMA. O restante foi excluído pelos mesmos motivos supracitados quando da análise do CD34. Considerando apenas se os tumores apresentavam imunomarcção positiva ou negativa para VEGF-A, observamos que 57% (n=23) apresentaram imunomarcção citoplasmática positiva desta citocina no parênquima tumoral e 70% (n=28) tiveram marcação no estroma, especialmente em citoplasma de fibroblastos e células endoteliais. Através da análise dos Eis, observamos escores ≥ 1 em 12 (29%) casos de CECO, quando da análise do parênquima tumoral, e 10 (24%) CECOs quando analisado o estroma. Desse modo, apesar de observarmos um grande número de CECOs VEGF-A positivos, a grande maioria desta casuística apresentou tumores com menos de 5% de células positivas, o que acarretou num grande número de amostras com EI igual a zero. A distribuição dos Eis e o respectivo percentual de células positivas de cada uma das 41 amostras analisadas pode ser visualizado na figura 22. O padrão de marcação do VEGF-A pode ser visualizado na Figura 21.

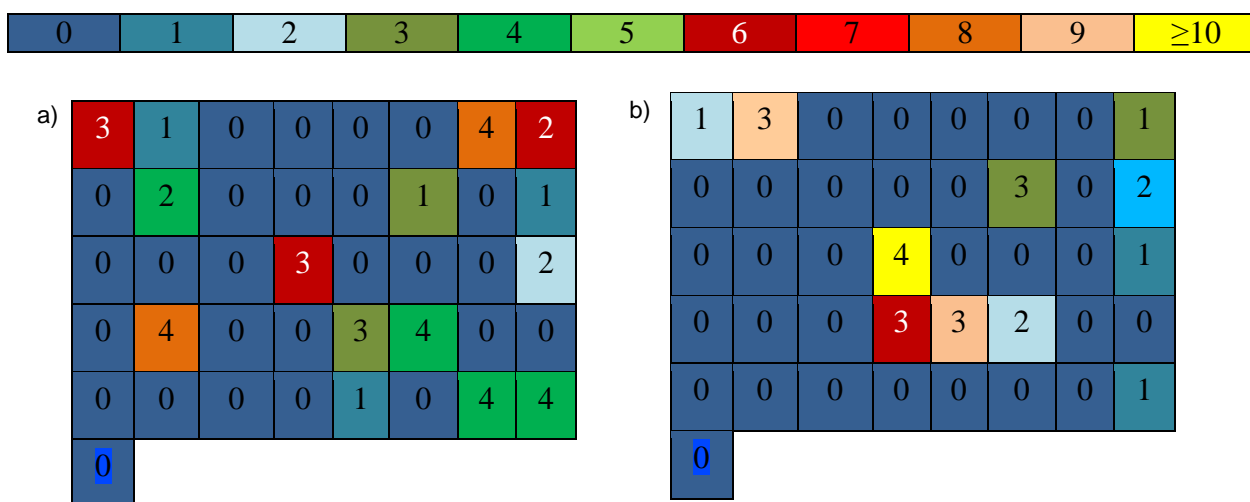


Figura 22. Distribuição dos Eis e percentual de células marcadas de VEGF-A na lâmina de TMA, considerando a) parênquima e b) estroma, separadamente. Salvador, Bahia, 2011.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0.31$; Teste de Mann Whitney), quando comparado a marcação de VEGF-A entre o estroma e o parênquima.

Os Eis de VEGF-A foram comparados considerando-se os diferentes parâmetros clínicos e gradação histológica. Os resultados podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6. Comparação dos EIS de VEGF-A entre os diferentes parâmetros clínicos e gradação histológica. Salvador, Bahia, 2011.

Parâmetros	VEGF-A parênquima				VEGF-A estroma		
	Total	Mediana	DP	p (valor)	Mediana	DP	p (valor)
Sexo							
Femino	13	2.23	2.826	0.53	0	1.801	0.32
Masculino	28	2.877	8.376		0	3.166	
Tamanho							
T1-T2	27	0.063	2.678	0.67	0	3.332	0.98
T3-T4	14	0.069	2.785		0	1.016	
Estádio clínico							
I-II	15	0	2.667	0.82	0	2.669	0.98
III-IV	26	0	2.741		0	2.852	
Linfonodo							
N0	14	0	2.054	0.86	0	1.730	0.51
N1-N3	22	0	2.787		0	3.111	
Infiltração perineural							
Sim	20	1	1.012	0.006	0	3.658	0.47
Não	19	0	3.197		0	1.465	
Invasão vascular							
Sim	7	0	3.388	0.62	0	4.536	0.59
Não	32	0	2.501		0	2.435	
Gradação Histológica							
Bem diferenciado	26	0	2.855	0.39	0	3.347	0.029
Moderadamente	14	0	2.424		0	0.267	
Local							
Língua	18	0	2.662	0.62	0	2.787	0.43
Palato	3	0	0		0	0	
Assoalho bucal	6	0	4.401		0	0	
Região retromolar							
gingiva	3	1	3.215		0	1.155	
Mucosa Jugal	3	0	3.309		0	4.5	
	6	1	1.506		0.5	3.521	

A imunomarcagem de VEGF-A foi maior no parênquima tumoral de CECOs com infiltração perineural quando comparada a marcação de tumores sem infiltração ($p=0.006$; Teste de Mann Whitney). Considerando-se o estroma tumoral, maiores índices de marcação de VEGF-A foi observada em carcinomas moderadamente diferenciado em comparação a tumores bem diferenciado. ($p=0.029$; Teste de Mann Whitney).

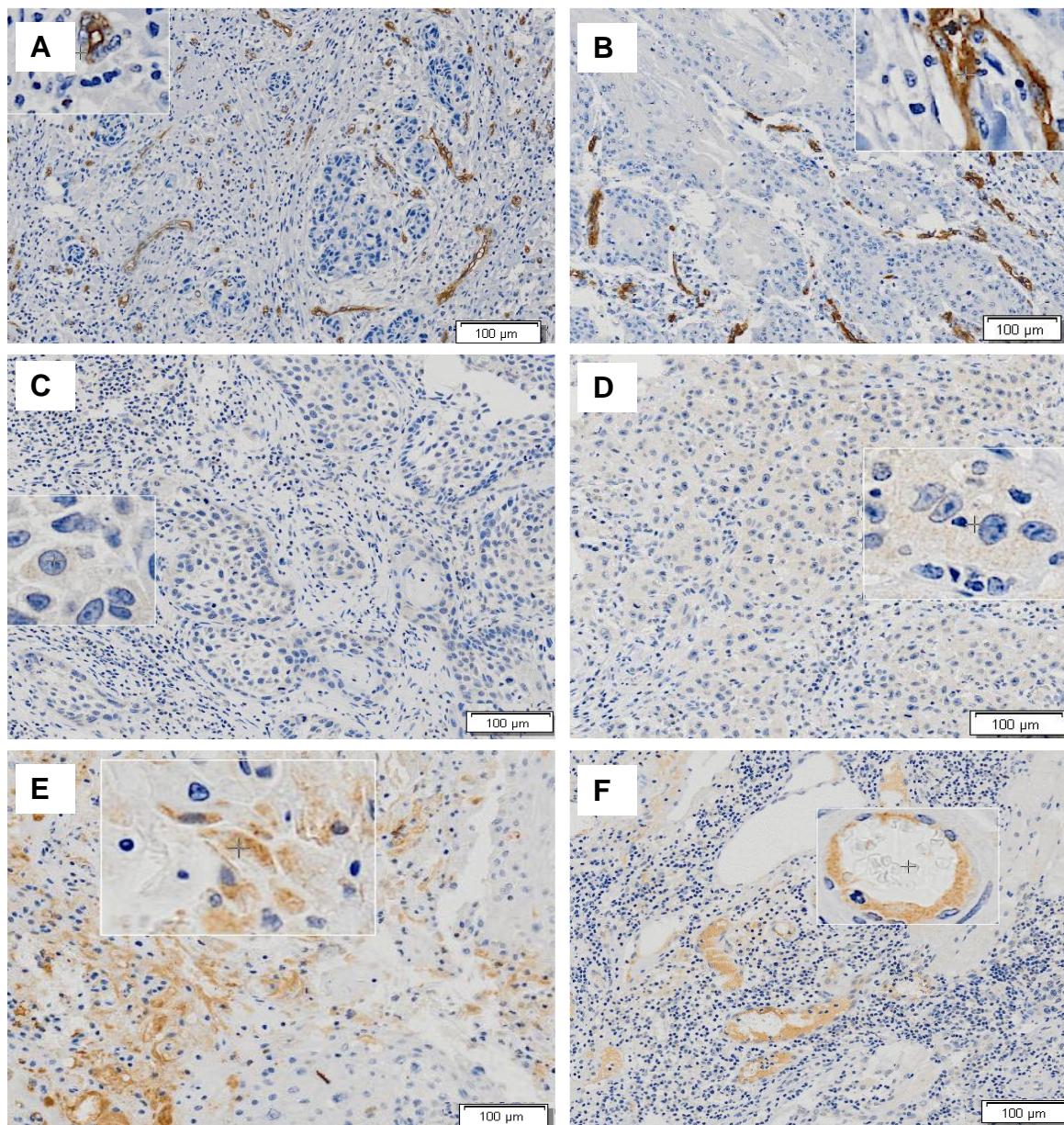


Figura 21. IHQ. (A) e (B) Padrão de imunomarcção da proteína CD34 em endotélios de áreas de “*Hot Spots*” em Carcinoma Escamocelular de boca. (C) e (D) VEGF. Imunomarcção citoplasmática granular em células do parênquima tumoral. (E) Imunomarcção citoplasmática granular em fibroblastos do estroma tumoral. (F) Imunomarcção citoplasmática granular em células endoteliais.

5.7 Correlação e comparação da expressão de *SHH* e *VEGF-A* com a MDV

Foi possível estabelecer a correlação entre a expressão dos genes *SHH* e *VEGF-A* e a MDV em 24 casos de CECOs. Esta análise foi possível, uma vez que estes casos estavam agrupados tanto entre os CECOs submetidos à análise molecular, como entre os casos passíveis de análise no TMA. Não observamos correlação entre os níveis de expressão de *SHH* e a MDV ($rs=0.07$; $p=0.71$; Teste de correlação de Spearman). Uma correlação positiva regular foi observada entre a expressão gênica de *VEGF-A* e a MDV, sendo esta correlação estatisticamente significativa ($rs=0.55$; $p=0.0050$; Teste de correlação de Spearman. Figura 23) (Tabela 7).

Tabela 7. Correlação da expressão gênica de *SHH* e MDV e *VEGF-A* e MDV. Salvador, Bahia, 2011.

Correlações	Coefficiente de Spearman (rs)	P	Intervalo de confiança
<i>SHH</i> e MDV	0.07	0.71	-0.347 a 0.476
<i>VEGF-A</i> e MDV	0.55	0.0050	0.181 a 0.787

Após detectarmos a correlação positiva entre MDV e *VEGF-A*, para fins comparativos, foi estabelecido um *cut off* para MDV, considerando-se para tanto a mediana de vasos/mm² nos casos de CECO submetidos a análise da MDV. Assim, estes CECOs foram dispostos em dois grupo: aqueles cuja MDV foi menor que a mediana da MDV de 19.82 vasos/mm² e CECOs que exibiam um valor maior que a mediana da MDV. Uma maior expressão de *VEGF-A* foi observada em tumores com MDV acima de 19.82 vasos/mm² ($p=0.017$; teste de Mann Whitney. Figura 25).

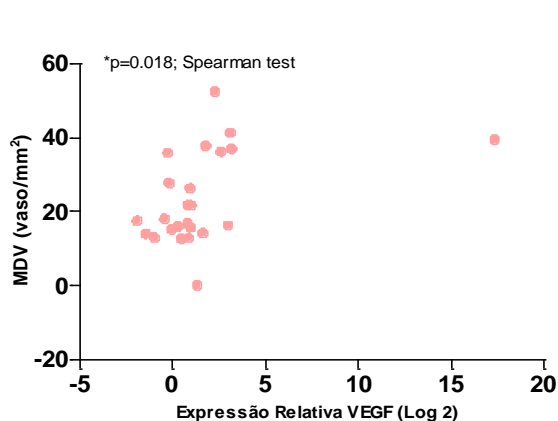


Figura 23. Correlação de *VEGF-A* e MDV. Salvador, Bahia, 2011.

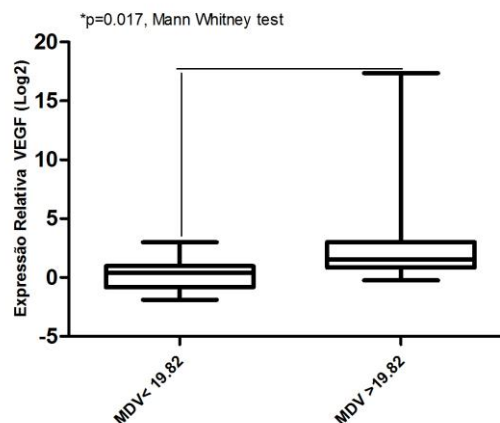


Figura 25. Comparação da expressão de *VEGF-A* em CECOs com MDV maior e menor que 19.82 vasos/mm². Salvador, Bahia, 2011.

6 DISCUSSÃO

Em torno de 263.900 novos casos de CECO são diagnosticados anualmente, sendo que 128.000 pacientes vão a óbito a cada ano (Jemal et al., 2011). No Brasil, a estimativa é que ocorram 14.170 casos novos no ano de 2012 (Brasil, INCA, 2012). Sendo assim, o câncer de boca é uma doença de interesse para saúde pública e estudos que contribuem para o conhecimento da patogênese deste tumor podem auxiliar na identificação de marcadores de diagnóstico, prognóstico e alvos terapêuticos.

Estudos anteriores com CECO concentraram-se em caracterizar e prever o comportamento tumoral com ênfase na análise da perda de heterozigidade e instabilidade de microsátélites em vários *loci* genéticos associados a genes supressores tumorais, como *p53*, *p16*, *C-ERB 2* e *RAS* (Ishwad et al.; 1996; SHAH et al., 2000).

Os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão deste tumor ainda são pouco conhecidos, mas algumas evidências científicas apontam para a existência de uma subpopulação de células-tronco, as quais são responsáveis pela manutenção e proliferação das células tumorais (Locke et al., 2005; Janes; Watt, 2006; Prince et al., 2007). Assim como as células-tronco teciduais, aquelas denominadas tumorais possuem a habilidade de auto-renovação e, segundo Reya et al. (2001) e Beachy et al. (2004) algumas vias de sinalização como a SHH e Wingless Type (WNT) podem estar associadas a este processo e, conseqüentemente, envolvidas na iniciação e progressão de tumores malignos em humanos.

É de nosso conhecimento apenas quatro trabalhos publicados na literatura que avaliam o papel da via SHH na tumorigênese do CECO humano (Cavicchioli Buim; Gurgel, 2011; Leovic et al. 2011; Schneider et al., 2011; Hanomi et al., 2011). Nosso grupo de pesquisa foi pioneiro em demonstrar a ativação da via SHH em CECO (Cavicchioli Buim; Gurgel et al., 2011) e, no mesmo período desta publicação, um grupo da Croácia (Leovic et al. 2011), também ressaltou que esta via pode estar envolvida na patogênese do CECO. Anteriormente, Nishimaki et al. (2004) estudaram sem muitos detalhes a via SHH em linhagem celular deste tumor.

Em outros tipos tumorais, como nos carcinomas pulmonares, hepáticos e pancreáticos, a participação da via SHH na ativação de genes de proliferação celular já está bem estudada (Bellusci et al., 1997; Grindley et al, 1997; Thayer et al, 2003;). Entretanto, sabe-se que esta

via de sinalização pode participar de outros processos celulares, como a angiogênese, o que vem sendo intensamente investigado em câncer de pâncreas (Yamazaki et al., 2009; Nakamura et al., 2010), fígado, de cólon, reto, pulmão e estômago (Olsen et al., 2004). Apenas Homani et al. (2011), demonstraram a participação da via SHH na angiogênese do câncer de boca, mesmo assim utilizando modelo experimental de camundongo. Dessa forma, este é o primeiro estudo que utiliza tecidos humanos, que investiga uma possível relação entre a via SHH e a angiogênese em CECO.

Considerando as características clínicas, em nosso estudo, a maioria (n=41; 62%) dos casos de CECO ocorreram em indivíduos do sexo masculino, corroborando com a OMS (2005), a qual aponta os homens como maiores consumidores de tabaco e álcool. O sítio intra-bucal mais acometido foi a língua (n=26;39%), concordando com a literatura (Kademani et al., 2005, Hunter et al., 2005; OMS, 2005). Segundo Kashiwazaki et al. (2008), o câncer de boca invade localmente os tecidos e ainda pode provocar metástases, como em linfonodos regionais, entretanto a invasão vascular não é freqüente, como também observado em nossa casuística, na qual somente 10 (15%) tumores apresentaram invasão vascular e 26 (39%) deles apresentaram metástase para linfonodo regional (tumores N1-N3).

O estudo da expressão gênica em tumores tem contribuído de forma singular para a medicina, sendo que a tecnologia do PCR quantitativo em tempo real representa o método de escolha para a caracterização e quantificação de transcritos gênicos. Entretanto, para que os resultados de diversos estudos sejam comparáveis, os cuidados durante a execução de cada uma das etapas do qPCR são essenciais para garantir a fidelidade dos dados e a reprodutibilidade biológica (Bustin, 2000; Bustin et al., 2005). Assim, todas as etapas das reações de qPCR foram cuidadosamente estudadas, as extrações de RNA realizadas em condições livre de RNases e todas as amostras tratadas com DNase. Dentre as etapas críticas para resultados válidos em qPCR, temos a normalização que minimiza as variações entre amostras nas etapas de extração do RNA, transcrição reversa e eficiências de amplificação, permitindo a comparação da concentração de RNAm em diferentes amostras (Bustin et al., 2009). Para normalização das nossas reações, utilizamos a média geométrica de dois genes referências de alta expressão, sendo este método mais robusto para fornecer normalizações mais precisas (Vandesompele et al., 2002; Huggett et al., 2005), especialmente quando trabalhamos com amostras neoplásicas.

Por último, este trabalho utilizou *Taqman Gene Expression Assays* que garantem

reações com 100% de eficiência e de maior especificidade. Enquanto que o outro sistema disponível, o *SYBR Green*, emite fluorescência ao se ligar a DNA de fita-dupla, incluindo produtos inespecíficos de amplificação, o sistema *Taqman*, por nós utilizado, usa sondas que interagem com uma sequência alvo complementar e emite fluorescência no momento em que a enzima *Taqman* polimerase esta promovendo amplificação, sendo assim um método mais específico.

Em nossas amostras, não detectamos transcritos de *SHH* e *HHIP* nos dois casos de mucosa normal de paciente saudável e apenas uma destas mucosas expressou *PTCH1*. Este resultado era esperado, uma vez que a expressão dos genes da via *SHH* é observada apenas durante a formação tecidual embrionária (Inghan; McMahon, 2001), e existe uma ausência de expressão destes genes em tecidos adultos (Stone et al., 1999; Dassule et al., 2000; Athar et al., 2006).

Concordando com nossos resultados, Cavicchioli Buim; Gurgel et al. (2011) e Leovic et al. (2011) não observaram expressão de *SHH* em mucosa normal de paciente saudável. Através de técnica IHQ, Schneider et al. (2011) também não observaram expressão de *SHH* em mucosa normal. No entanto, Cavicchioli Buim; Gurgel et al. (2011) não constataram expressão de *PTCH1* em suas três amostras de mucosa normal, enquanto que em nosso estudo uma das 2 mucosas expressou este gene. Leovic et al. (2011) também descreveram expressão de *PTCH1* em mucosa normal, tanto de paciente fumante quanto nos não fumantes. Esta diferença nos resultados pode ser explicada pelas diferenças nos métodos de amplificação utilizados, enquanto este trabalho foi desenvolvido com *Taqman*, os outros dois estudos utilizaram *SYBR Green*. Os resultados do trabalho de Kusano et al. (2005), utilizando um modelo de isquemia no miocárdio de camundongos, sugerem que a expressão de componentes da via *SHH* pode ser observada em tecidos adultos quando estes são submetidos a injúria. Desse modo, uma outra explicação para a expressão de *PTCH1* observada em um dos casos de MNN, pode ser por condições orgânicas próprias do paciente doador desta amostra, como a presença de um processo inflamatório ou de cicatrização, que não foi passível de identificação.

Em 33 (66%) CECOs e 5 (63%) MATs houve expressão de *SHH* e, apesar da expressão deste gene ter sido maior no grupo dos carcinomas, não observamos diferença estatisticamente significativa quanto a expressão de *SHH* entre CECO e MAT. Resultado similar foi descrito por Cheng et al. (2009) quando investigaram a expressão de *SHH* em

hepatocarcinoma e em tecido hepático não neoplásico adjacente ao tumor. Leovic et al. (2011) também descreveram expressão do gene *SHH* em CEC de cabeça pescoço, além disso identificaram, através de técnica IHQ, imunomarcagem positiva de SHH em 86% da sua amostra. Ao contrário, Cavicchioli Buim; Gurgel et al. (2011) não encontraram expressão do gene *SHH* em CECO e mucosa não neoplásica adjacente aos tumores. Entretanto, devemos considerar que o gene *SHH* é constituído por apenas 3 éxons (Lee et al., 1994; Muenke et al., 1995) e estudando os iniciador desenhado por Cavicchioli Buim; Gurgel et al. (2011), constatamos que o mesmo anelava no exón 2, enquanto que o iniciador utilizado neste estudo anelava entre o exón 2 e 3. Além disso, houve também diferenças entre os sistemas de detecção utilizados, conforme relatado anteriormente. É possível também que as diferenças de resultados sejam ocasionadas devido a presença de metilação na região promotora do gene *SHH*, mas isto precisa ser melhor investigado. Segundo os resultados do estudo de Wang et al. (2006) houve uma ausência de expressão de SHH em amostras de carcinoma e displasia gástrica nas quais a região promotora de SHH estava metilada.

A superexpressão do ligante SHH é apenas uma das alterações genéticas que podem ser observadas em neoplasias em que a via SHH está ativada (Berman *et al.* 2003; Ma et al., 2006). Outras alterações em genes dessa via podem ser responsáveis pelo desenvolvimento tumoral, e a mutação de *PTCH1* já está bem estabelecida na patogênese do meduloblastoma (Raffel *et al.* 1997), expressão de *Gli1* em gliomas (Kinzler *et al.* 1988) e ativação mutacional de *SMO* em tumores de próstata (Karhadkar et al., 2004). Em CCB e na SCNBC, várias alterações em genes da via SHH são descritas, tais como: mutações no gene *PTCH1*, superexpressão de *SHH* e ativação dos fatores de transcrição Gli (Gorlin, 1995; Waltherhouse; Yoon; Iannaccone, 1999; Altaba; Sánchez; Dahmane, 2002).

Dentre os grupos de genes que participam do desenvolvimento de neoplasias, o *PTCH1* é considerado supressor tumoral e regulador negativo da via SHH (HAHN et al., 1999; Inghan; McMahon, 2001). Ao mesmo tempo em que é regulador negativo, o gene *PTCH1* também é alvo genético dos fatores de transcrição Gli1 (Xie et al., 1998; Barreto et al., 2002; Wetmore, 2003) e, dessa forma, a expressão do mesmo indica a ativação (Xie et al., 1998; Bale; Yu, 2001; Grachtchouk et al., 2006) e desregulação autocatalítica da via SHH (Wetmore, 2003). O mesmo ocorre com *HHIP*, que é bloqueador da via e também alvo dos seus fatores de transcrição. Logo, juntamente com *PTCH1*, a expressão de *HHIP* pode representar ativação desta via (Olsen et al., 2004). Dessa forma, nossos resultados para a expressão de *PTCH1* e *HHIP*, tanto em CECO quanto em MAT, sugerem que a via SHH está

ativada nestas lesões, além de concordar com as conclusões de Cavicchioli Buim; Gurgel et al. (2011) que foram pioneiros em demonstrar que a via SHH está ativada em câncer de boca.

Observamos uma correlação positiva regular entre *SHH* e *HHIP* ($rs=0.44$; $p=0.0014$) e *SHH* e *PTCH* ($rs=0.49$; $p=0.0003$), o que permite sugerir que em CECOs SHH+, o ligante pode ter participação na ativação da via. Ainda neste aspecto, os resultados de Leovic et al. (2011) e Schneider et al. (2011) também sugerem a existência de tumores positivos e negativos para SHH. Já em tumores SHH-, o morfógeno desencadeador da cascata sinalizadora está ausente, o que abre perspectivas para trabalhos que investigam moléculas reguladoras da via SHH. Em adição, os resultados do trabalho de Cavicchioli Buim; Gurgel et al. (2011) sugerem que a via SHH, em CECO, pode estar ativada através de um mecanismo independente do ligante. Além disso, é fundamental avaliar a expressão dos componentes da via SHH considerando-se as peculiaridades do CECO, tais como diferenciação histológica, estadiamento, entre outros aspectos. Neste aspecto, em nossa casuística, uma maior expressão de *SHH* foi observada em CECO moderadamente diferenciado quando comparado ao CECO bem diferenciado, o que sugere que a expressão de SHH possa estar relacionada ao grau de diferenciação do tumor.

Em adição, observamos maiores níveis de RNAm de *PTCHI* em tumores com infiltração perineural. Não encontramos na literatura, estudos que envolvia a análise da expressão do gene *PTCHI* com infiltração vascular e/ou perineural. Entretanto, Cavicchioli Buim, Gurgel et al. (2011) e Leovic et al. (2011) demonstraram maiores níveis do transcrito em tumores com menos grau de diferenciação. Ainda neste aspecto, Yang et al. (2010) observaram maior expressão da proteína PTCH1 em carcinoma pancreático com características clínicas e histológicas de maior agressividade.

Um resultado muito significativo do nosso estudo e que abre perspectivas para novas investigações, foi a demonstração que a via SHH também parece estar ativada em MAT. Este resultado sugere a presença de alterações genéticas em células da mucosa próxima ao sítio tumoral, mesmo que estas não reflitam em alteração arquitetural da MAT, além de corroborar com a teoria “*field cancerization*”. Esta teoria descreve que no CEC de cabeça e pescoço, distintas áreas da mucosa aéreo digestiva são afetadas por longos períodos de exposição a carcinógenos, resultando em campos geneticamente alterados nos quais carcinomas multifocais podem desenvolver-se (Perez-Ordonñez et al., 2006).

Conforme ressaltado anteriormente, o papel da via SHH na formação de novos vasos sanguíneos já foi descrito por Rowitch et al. (1999) e Pola et al. (2001). Assim, a identificação da atividade da via SHH em CECO abre perspectivas para a participação desta via não somente na iniciação do CECO, mas também na angiogênese tumoral. Sabe-se que a via SHH pode contribuir para a angiogênese, estimulando a secreção de fatores angiogênicos por células do estroma e pela ativação de CE e CPEs (Olsen et al., 2004; Yamazaki et al., 2008, Nakamura et al., 2010; Chinchilla et al., 2010). Segundo Pola et al. (2001) e Lee et al. (2007), a interação do ligante SHH com células mesenquimais estimula a liberação de fatores pró-angiogênicos, como o VEGF. Em nosso estudo, uma correlação positiva regular ($rs=0.44$; $p=0.0007$) foi constatada entre a expressão de *SHH* e *VEGF-A*. Neste aspecto, nosso trabalho é pioneiro em sugerir que a via SHH pode ter participação na angiogênese de CECO humano. Em setembro deste ano, Hanomi et al. demonstraram que em tumores xenográficos implantados em camundongos que o bloqueio na expressão de *SHH* provoca uma redução da formação de novos vasos. A via *SHH* também pode estimular a angiogênese tumoral pelo recrutamento de CPEs, como foi demonstrado experimentalmente em câncer de pâncreas por Nakamura et al. (2010). Este papel da via no estímulo de CE para a formação de novos vasos ainda precisa ser investigado em CECO.

Folkman et al. (1971) propôs pela primeira vez que o desenvolvimento de novos vasos é fundamental para o crescimento tumoral. E vários autores referem-se a participação da angiogênese na progressão de tumores (Vaupel et al., 1989; Swelam et al., 2005; Sharma; Sharma; Sarkar, 2005). A formação de novos vasos também parece contribuir para transformação e iniciação neoplásica de células (Hlatky et al. 2002), sendo observada antes mesmo da identificação macroscópica de lesões malignas em modelos experimentais, sugerindo que os eventos angiogênicos são essenciais para a expansão clonal de neoplasias (Hanahan; Weinberg, 2000). Dentre os fatores angiogênicos, o *VEGF-A* caracteriza-se por ser o fator mais relacionado com a carcinogênese de neoplasias malignas humanas e desenvolvimento de metástases (Dvorak et al., 1995; Ferrara, 1999; Sauter et al., 1999; Shao et al., 2008), participando da proliferação e migração de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular e destruição da matriz extracelular (Roberts; Palade, 1995; Ferrara, 1996).

Em nosso estudo, uma maior expressão de *VEGF-A* foi detectado em MAT, quando comparada ao CECO ($p=0.034$). Este resultado, assim como o achado de que a via SHH está ativada em mucosa próxima ao tumor, contribui para a teoria que existe um campo de

cancerização, mesmo quando alterações histológicas e citológicas não são observadas nas margens tumorais. Além de sugerir que a mucosa próxima ao sítio tumoral pode estar contribuindo para secreção de fatores de crescimento para o tumor propriamente dito. Tae et al. (2000) investigaram a expressão de VEGF-A em um modelo de progressão de neoplasia maligna, através de imuno-histoquímica, e demonstraram uma maior expressão de VEGF-A em mucosa normal e uma redução da sua expressão com a progressão da lesão para hiperplasia, displasia e carcinoma invasivo. Ao contrário, Margaritescu et al. (2010), através de análise de imunofluorescência, observaram maiores índices de *VEGF-A* em CECO do que em lesões pré-malignas e mucosa normal.

Maior expressão de *VEGF-A* foi observada em CECOs agrupados em T3-T4 em comparação ao grupo de tumores T1-T2. CECO estágio III-IV apresentaram maiores níveis de transcrito de *VEGF-A* quando comparados com aqueles classificados como estágio I-II ($p=0.047$). Maiores níveis de RNAm deste fator angiogênico também foram identificados em carcinoma oral com invasão de linfonodos regionais (N1-N3) em relação àqueles classificados como N0 ($p=0.019$). Shang et al. (2006) relataram uma maior expressão da proteína VEGF-A em CECO com envolvimento de linfonodos cervicais. Por último, a expressão de *VEGF-A* foi maior em tumores com invasão vascular em comparação as lesões sem invasão, apesar de não observarmos diferença estatisticamente significativa ($p=0.056$). Li et al. (2005) demonstraram, através de análise imuno-histoquímica, que carcinoma oral estágio de invasão III-IV apresentaram maior imunomarcção para VEGF-A do que tumores estágio de invasão I-II. Não encontramos na literatura estudos que avaliam os níveis do transcrito *VEGF-A* em CECO.

Considerando-se a localização da proteína VEGF-A, a imunomarcção indicou positividade em citoplasma de células do parênquima e estroma de CECO. Tae et al. (2000), Uehara et al. (2004) e Li et al. (2005), também descreveram marcação citoplasmática de VEGF-A no parênquima e no estroma de câncer de boca. Verificamos que no parênquima tumoral os EIs para VEGF-A foram maiores em tumores moderadamente diferenciados em comparação a tumores bem diferenciados ($p=0.029$), em contraste ao descrito por Shintani et al. (2004) que observaram marcação mais expressiva de VEGF-A em carcinoma oral bem diferenciado. Vale ressaltar que estes autores utilizaram um método de análise diferente do nosso, considerando apenas se a imunomarcção era positiva ou negativa e não consideraram a divisão, parênquima e estroma. Observamos, no estroma tumoral, maiores índices imunohistoquímicos de VEGF-A em tumores com infiltração perineural em comparação a

lesões sem infiltração. De fato, a intrínseca relação entre VEGF-A e angiogênese, coloca esse fator de crescimento como um dos possíveis sinais moleculares associados a tumores mais invasivos (Sauter et al., 1999; Shao et al., 2008).

Descrevemos uma correlação positiva regular entre a expressão gênica de *VEGF-A* e a MDV ($rs=0.47$; $p=0.018$). Entretanto, Tae et al. (2000), através de marcação IHQ, não observaram correlação entre MDV e imunomarcação de VEGF-A em CEC de cabeça e pescoço. Além disso, considerando a mediana de MDV (19.82 vasos/mm²) como *cut off*, a expressão gênica de *VEGF-A* foi maior em CECO com MDV acima da mediana em comparação a tumores com MDV abaixo da mediana. Estes resultados sugerem que VEGF-A pode estar contribuindo para formação de novos vasos em CECO.

Nossos resultados de expressão gênica e de marcação IHQ do fator angiogênico VEGF-A, demonstraram que CECO com comportamento mais agressivo apresentaram maiores níveis de expressão tanto do transcrito quanto desta proteína. A correlação positiva entre MDV e expressão gênica de *VEGF-A*, juntamente com a observação de maiores níveis de *VEGF-A* em tumores com maiores índices de MDV, sugerem que VEGF-A contribui para formação de novos vasos em CECO. Desse modo, o VEGF pode ser um importante indicador de prognóstico ou ainda um possível alvo terapêutico para os antiangiogênicos utilizados no tratamento do CECO, uma vez que alguns estudos mostram uma possível redução de tamanho do tumor de boca quando os mesmos são tratados com fatores antiangiogênicos. Recentemente, Yasuo et al. (2010), em modelo experimental de camundongo *nude*, utilizaram AdVEGF-ExR (receptor de VEGF fusionado com porção Fc de IgG humana) para bloquear VEGF e observaram uma redução do tamanho tumoral e da MDV em CECO de camundongos tratados em comparação aos animais não tratados. Yang et al. (2009) também investigaram o efeito do bloqueio da angiogênese em carcinoma oral. Neste estudo, CECO foi produzido pela utilização de 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) e a talidomida foi usada como bloqueador, e uma redução da formação de novos vasos foi observada em animais tratados em comparação aos que não receberam tratamento.

Sabendo que a via SHH pode contribuir para a expressão de VEGF, como sugerido pelos nossos resultados e por Hanomi et al. (2011), o bloqueio da via SHH também pode ser uma estratégia terapêutica para o tratamento de tumores cuja a via está ativada. Estudos experimentais já foram conduzidos com outras neoplasias, como o trabalho de Nakamura et al. (2010) que usaram ciclopamida para bloquear a via SHH em tumores xenográficos de

adenocarcinoma pancreático e observaram uma redução da angiogênese tumoral.

Muitos trabalhos na literatura descrevem que a via SHH participa do crescimento tumoral, primariamente, através de sinalização autócrina, estimulando a sobrevivência e a proliferação de células do parênquima, como no câncer de pâncreas (Thayer et al, 2003). Inclusive Nishimaki et al. (2004) e Schneider et al. (2010) demonstraram participação autócrina da via SHH no crescimento tumoral do CECO. Entretanto, também observa-se uma atuação parácrina da via SHH na qual células do parênquima estariam secretando ligantes da via e estimulando as células do estroma, como no câncer intestinal (Yauch et al., 2008). Atuação parácrina da via SHH foi demonstrada por Leovic et al. (2011) e Hanomi et al. (2011) em CECO. Uma crítica ao nosso trabalho, foi ainda não ter investigado a marcação imunohistoquímica dos componentes da via *Sonic*, desse modo, não podemos afirmar se a via SHH está estimulando a secreção de *VEGF-A* pela ativação de células do parênquima ou do estroma. Entretanto, recentemente adquirimos os anticorpos SHH, PTCH1 e HHIP, os quais estão em fase de padronização e, em breve, esperamos demonstrar esse resultado no artigo que resultará dessa dissertação de mestrado.

Verificamos imunomarcação de VEGF-A em células do parênquima tumoral, conforme descrito por Berse et al. (1992), assim como observamos células do estroma, especialmente fibroblastos, expressando tal proteína. Segundo trabalhos experimentais discutidos na literatura, a via SHH pode estimular células mesênquimais, especialmente fibroblastos, a secretarem fatores pró-angiogênicos (Pola et al., 2001; Lee et al. 2001; Nakamura et al., 2010). Os nossos resultados imuno-histoquímicos, somados àqueles obtidos com a expressão gênica, sugerem que a via SHH pode ter participação na expressão de VEGF-A pelos fibroblastos de CECO. Soma-se ainda que o VEGF-A é gene alvo da via SHH e a identificação desta proteína também em células do parênquima indica atividade desta via de sinalização em células deste tumor.

Em nosso estudo, observamos marcação de VEGF-A no citoplasma de CE, possivelmente esta citocina foi internalizada e esta exercendo a sua função. Mas ainda é preciso melhor avaliar a participação da via SHH na ativação das CE, o que seria possível através de co-localização entre proteínas desta via e marcadores de CE, em especial PTCH1 e CD34, bem como HHIP e CD34.

O estudo da formação de novos vasos em uma neoplasia é comumente realizado

através da análise da MDV, e esta pode estar associada com o prognóstico e o desenvolvimento de metástases (de Jong, van Diest, Baak, 2000; Marion-Audibert et al., 2003). O estudo da MDV consiste em selecionar áreas de maior vascularização (*Hot Spots*) e que refletem a angiogênese tumoral, sendo o bloqueio da neovascularização alvo para terapia do câncer (Couverlad et al., 2009). Segundo Vermeulen et al. (2002), as áreas de *hot spots* originam-se de clones de células tumorais com maior potencial angiogênico e de metástase.

Diferentes marcadores imuno-histoquímicos e métodos de contagem são descritos na literatura para avaliar a MDV, o que tem inviabilizado a comparação entre os trabalhos. Existe uma divergência sobre a utilização de TMAs para análise de MDV e inclusive Chapin et al. (2004) e Yao et al. (2007) sugerem que a utilização destes não seja uma boa alternativa para avaliar este parâmetro em neoplasias, uma vez que o tamanho dos cortes limite a análise do estroma tumoral. Estes autores avaliaram MDV em câncer de mama e fígado, respectivamente, e não encontraram associação significativa entre prognóstico e MDV quando utilizaram *tissue microarray*, enquanto que largos cortes parafinados mostraram resultados significantes. No entanto, Chebib et al. (2007) avaliou MDV em lâminas de TMA de hepatocarcinoma e observaram resultados significativos, como maiores níveis de microvasos em tumores com invasão linfática e vascular.

Esse foi o primeiro estudo do grupo utilizando TMAs e realmente sentimos dificuldade na análise da MDV utilizando lâminas de microarranjos. Entretanto, não podemos afirmar que isso tenha prejudicado nossos resultados, uma vez que as áreas dispostas nas lâminas foram previamente selecionadas como as mais representativas dos CECOs e por um patologista experiente. Além disso, todos os casos com menos de 3 áreas que pudessem ser avaliadas, foram excluídas de nossa casuística. Os trabalhos publicados na literatura utilizam em média a análise de cinco áreas de *hot spots*, em cada tumor avaliado.

Em nosso estudo não constatamos associação estatisticamente significativa quando comparamos a MDV entre os diferentes fatores de prognóstico, como invasão vascular e de linfonodos regionais, tamanho do tumor, infiltração perineural, gradação histológica e estadiamento clínico, resultados similares foram descritos por Margaritescu et al. (2008), sendo que estes autores estudaram a MDV utilizando CD105, marcador que tem se destacado no estudo da angiogênese tumoral, (MINHAJAT et al. 2006). Portanto, mais investigações, com diferentes protocolos e marcadores imuno-histoquímicos, são necessárias para validar a MDV como indicador de prognóstico em câncer de boca.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem sugerir que:

-A expressão de *HHIP* e *PTCH1* em CECO são indicativos de que via SHH está ativada nesta doença. Além disso, esta ativação pode ser dependente de ligante (CECO SHH+) ou não (CECO SHH-). Ao mesmo tempo, a correlação positiva entre a expressão gênica de *SHH* e *VEGF-A* indica esta via pode participar da angiogênese tumoral. Além disso, isoladamente, a expressão do gene *VEGF-A* foi o fator que mais contribuiu para uma maior MDV nesta casuística. Uma maior expressão deste fator, em nível de transcrito e de proteína, esteve relacionado a CECO de comportamentos mais agressivos.

-A expressão de *HHIP*, *PTCH1* e *VEGF-A* em MAT indica que via SHH pode estar ativada nas margens tumorais e, corrobora para a existência de um campo de cancerização que envolve tecidos fenotipicamente normais. Ao mesmo tempo, uma maior expressão gênica de *VEGF-A* nesta localização, sugere que células da margem tumoral podem participar ativamente na secreção de fatores de crescimento para o tumor propriamente dito.

REFERÊNCIAS

Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*. 2008; 8: 464-8.

Adolphe C, Narang M, Ellis T et al. An in vivo comparative study of sonic, desert and Indian hedgehog reveals that hedgehog pathway activity regulates epidermal stem cell homeostasis. *Development*. 2004;131: 5009-19.

Altaba AR, Sánchez P, Dahmane N. Gli and Hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nature*. 2002;2(5):361-2.

Asai J, Takenaka H, Kusano KF et al. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation*. 2006;113(20):2413-24.

Athar M, Tang X, Lee JL et al. Hedgehog signalling in skin development and cancer. *Exp Dermatol*. 2006;15:667-77.

Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(5):329-37.

Bahar G, Feinmesser R, Shpitzer T et al. Salivary analysis in oral cancer patients: DNA and protein oxidation, reactive nitrogen species, and antioxidant profile. *Cancer*. 2007;109(1):54-59.

Bale AE, Yu KP. The Hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Hum Mol Genet* 2001;10:757-762.

Barreto DC, Bale AE, De Marco et al. Imunolocalization of PTCH protein in Odontogenic Cysts and Tumors. *J Dent Research* 2002;81:757-760.

Beachy PA, Karhadkar SS, Berman D. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004;432(7015):324-331.

Bellusci S, Furuta Y, Rush MG et al. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development*. 1997;124(1):53-63

Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(6):401-10.

Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation growth of digestive tract tumours. *Nature*. 2003;425:846-51.

Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*. 1996 ;6(3):298-304.

Brasil. Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2. Acesso em 03 de novembro de 2011, 11:52:32

Brasil. Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca/definicao>. Acesso em 26 de janeiro de 2012, 11:55:15

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM:

classificação de tumores malignos. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

Brennan JA, Boyle JO, Koch WM et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 1995;332(11):712–7.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25,(2):169–193.

Bustin SA; Benes V, Nolan T et al. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol*. 2005;34(3):597-601.

Bustin SA, Benes V, Garson JA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.

Califano J, Van Der Riet P, Westra W et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996 ;56(11): 2488-92.

Callender T, El-Naggar AK, Lee M et al. PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer (Phila.)* 1994;74:152-158.

Cancela MC, Voti L, Guerra-Yi M et al. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *HEAD & NECK* 2010; 32(3): 357-367.

Carpenter D, Stone DM, Brush J et al. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(23):13630-34.

Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2004;108(5):741-9.

Cavicchioli Buim ME, Gurgel CAS, Ramos EAG et al. Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. *Human Pathol*. 2011;42(10):1484-90.

Chari NS, McDonnell TJ. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. *Adv Anat Pathol*. 2007;14(5):344-52.

Charpin C, Dales JP, Garcia S et al. Tumor Neoangiogenesis by CD31 and CD105 Expression Evaluation in Breast Carcinoma Tissue Microarrays. *Clinical Cancer Research* 2004;10:5815-19.

Chebib I, Shabani-Rad T, Chow MS et al. Microvessel Density and Clinicopathologic Characteristics in Hepatocellular Carcinoma With and Without Cirrhosis. *Biomarker Insights* 2007;2:59–68.

Chinchilla P, Xiao L, Kasanietz MG et al. Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cyle*. 2010;9(3):570-79.

Choi WW, Lewis MM, Lawson D et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family. *Mod Pathol*. 2005;18(1):143-52.

Couvelard A, Deschamps L, Ravaud P et al. Heterogeneity of tumor prognostic markers: a reproducibility study applied to liver metastases of pancreatic endocrine tumors. *Modern Pathology*. 2009;22:273–281.

Dassule SM, Lewis P, Bei M et al. Sonic Hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 2000;127:4775-85.

De Jong JS, Van Diest PJ, Baak JPA. Hot spot microvessel density and the mitotic activity index are strong additional prognostic indicators in invasive breast cancer. *Histopathology*. 2000;36:306-12.

Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107: 233–5.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14): 2413-22

Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77: 527–43.

Gillespie MB, Rubinchik S, Hoel B, Sutkowski N. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer: what you need to know in 2009. *Curr Treat Options Oncol*. 2009;10(5-6):296-07.

Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol*. 2001 ;13(3):183-8.

Goodrich LV, Lilenkovic L, Higgins KM et al. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*. 1997;277(5329):1109-13.

Goodrich LV, Scott MP. Hedgehog and patched in neural development and disease. *Neuron*. 1998; 21(6):1243-57.

Gorlin RJ. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Clin* 1995;13(1):113-25.

Grachtchouk M, Liu J, Wang, A et al. Odontogenic Keratocyst arise from quiescent epithelial rests and are associated with deregulated Hedghog signaling in mice and humans. *Am J Pathol* 2006;169:806-13.

Grindley JC, Bellsai S, Perkins D et al. Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. *Dev Biol*. 1997;188(2):337-48.

Hahn H, Wojnowski L, Miller G, Zimmer A. The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animals models. *J Mol Med*. 1999;77(6):459-68.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

Hlatky L; Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst*, 2002;94(12):383-93.

Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe P. The Shh signaling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development*. 1998;125(15):2803-11.

Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*. 1993 ;329(18):1318-27.

Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M et al. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *CancerSpectrum Knowledge Environment*. 2003;95:1772–83.

Honami T, Shimo T, Okui T et al. Sonic hedgehog signaling promotes growth of oral squamous cell carcinoma cells associated with bone destruction. *Oral oncol*. 2011.[Epub ahead of print].

- Huggett J, Dheda K, Bustin S et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005;5(4):279-84.
- Hunter KD, Parkinson EK; Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2005;5:127-35.
- Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 2001;15(23):3059-87.
- Ishwad CS, Ferrel RE, Rossie KN et al. Loss of heterozygosity of the short arm of chromosomes 3 and 9 in oral cancer. *Int J Cancer.* 1996;20(1):1-4.
- Janes SM, Watt FM. New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(3):175-83.
- Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006;56:106-30.
- Jemal A, Bray F, Center MM et al. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69–90.
- Johnson N, Franceschi S, Ferlay J et al. Squamous cell carcinoma. In: World Health Organization Classification of tumors. 2005:168-75.
- Kademani D, Bell RB, Bagheri et al. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(11):1599-605.
- Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24:2666-72.
- Kanda S, Y Mochizuki, Suematsu T et al. Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8244-9.
- Karhadkar SS, Hassan NM, Abdallah N et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature.* 2004;431(7009):707-12.
- Kashiwazaki H, Hassan NM, Hamada J et al. Gene expression profile changes correlated with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Odontology.* 2008;96(1):38-43.
- Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(10):1050-4.
- Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med.* 2009;9(7):873-86.
- Kawakita D, Hosono S, Ito H et al. Impact of smoking status on clinical outcome in oral cavity cancer patients. *Oral Oncol.* 2011 Oct. [Epub ahead of print]
- Kinzler KW, Ruppert , Bigner SH et al. The Gli gene is a member of Kruppel family of zinc finger protein. *Nature.* 1988;30:434-42.
- Kogerman P, Grimm T, Kogerman L et al. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol.* 1999;1(5):312-9.
- Krishnan V, Elberg G, Tsai M, et al. Identification of a Novel Sonic Hedgehog Response Element in the Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II Promoter. *Mol. Endocrinol.* 1997;11(10):1458-1466.

- Kusano KF, Pola R, Murayama T et al. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med.* 2005;11(11):1197-204.
- Kusu I, Bicknell R, Harris AL et al. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J Clin Pathol.* 1992; 45(2):143-8.
- Lambert R, Sauvaget C, Cancela MC et al. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2011; 23(8): 633-641.
- Lauth M, Bergström A, Shimokawa T et al. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(20):8455-60.
- Lavine KJ, Kovacs A, Ornitz DM. Hedgehog signaling is critical for maintenance of the adult coronary vasculature in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2404-14.
- Lee JJ, Ekker SC, Von Kessler DP et al. Autoproteolysis in hedgehog proteins biogenesis. *Science* 1994;266:1528-1537.
- Lee S, Moskowitz MA, Sims JR. Sonic Hedgehog inversely regulates the expression of angiopoetin 1 and angiopoetin 2 in fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2007;19(3):445-451.
- Lejbkowitz F, Goldberg-Cohen I, Levy AP. New horizons for VEGF. Is there a role for nuclear localization? *Acta histochemica* 2005;106:405-411.
- Leovic D, Sabol M, Ozretic P et al. Hh-Gli signaling pathway activity in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2011 [Epub ahead of print] .
- Li C, Shintani S, Terakado N et al. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005;34:559–565.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) method. *Methods.* 2001;25:402–408.
- Locke M, Heywood M, Fawell S et al. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res.* 2005;65(19):8944-50.
- Lord CJ, Ashworth A. Biology-driven cancer drug development: back to the future. *BMC Biol.* 2010;8:38.
- Ma Y, Gong R, Yao S et al. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell* 2002;111:63-75.
- Machado J, Reis PP, Zhang T, et al. Low prevalence of human papillomavirus in oral cavity carcinomas. *Head Neck Oncol.* 2010;2:6.
- Margaritescu C, Simionescu C, Mogoanta L et al. Endoglin (CD105) and microvessel density in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol.* 2008;49(3):321-6.
- Margaritescu C, Pirici D, Stinga A et al. VEGF expression and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical and morphometric study. *Clin Exp Med.* 2010;10(4):209-14.
- Marion-Audibert AM, Barel C, Gouysse G et al. Low microvessel density is an unfavorable

- histoprogenetic factor in pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology*. 2003;125(4):1094-104.
- Marur S, D'souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*. 2010;11:781–89.
- Méndez E, Cheng C, Farwell DG et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2002;95(7):1482-94.
- Mille F, Chantal T, Fombonne J et al. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nat Cell Biol*. 2009;11(6):739–746.
- Minhajati R, Mori D, Yamasaki F. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathol Int* 2006;56(12):717-23.
- Motoyama J, Heng H, Crackower MA. Overlapping and non-overlapping Ptch2 expression with Shh during mouse embryogenesis. *Mech Dev*. 1998;78(1-2):81-4.
- Muenke M, Bone LJ, Mitchell HF, Hart I et al. Physical mapping of the holoprosencephaly critical region in 21q22.3, exclusion of SIM2 as a candidate gene for holoprosencephaly, and mapping of SIM2 to a region of chromosome 21 important for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 1995;57:1074-9.
- Nakamura K, Sasajima J, Mizukami Y et al. Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone-marrow derived pro-angiogenic cells. *PLoS One*. 2010 Jan 21;5(1):e8824.
- Nishimaki H, Kasai K, Kozaki K et al. A role of activated Sonic Hedgehog signalling for the cellular proliferation of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Biochemical and Biophysical research communication*. 2004;314:313-329.
- Olsen CL, Hsu PP, Glienke J et al. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. *BCM Cancer*. 2004;4(43):1-11.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer*. 1993;54:594–606.
- Pelucchi C, Talamini R, Levi F et al. Fibre intake and laryngeal cancer risk. *Ann Oncol* 2003;14(1):162-7.
- Pereira F. A., Qiu Y., Tsai M. L and Tsai S. Y. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 1995; 53: 503–08.
- Pereira FA, Qiu Y, Zhou G et al. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev*. 1999;13(8):1037-49.
- Peréz-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol*. 2006;59:445–53.

Pitiyage G, Tilakaratne WM, Tavassoli M et al. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(10):737-52.

Pola R, Linge LE, Silver M et al. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med.* 2001;7(6):706-11.

Prince SN, Foulstone EJ, Zaccheo OJ et al. Functional evaluation of novel soluble insulin-like growth factor (IGF)-II-specific ligand traps based on modified domain 11 of the human IGF2 receptor. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(2):607-17.

Qin J, Chen X, Xie X, et al. COUP-TFII regulates tumor growth and metastasis by modulating tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(8):3687-92.

Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer.* 2009;45(11):1924-34.

Raffel C, Jenkins RB, Frederick L et al. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res.* 1997;57(5):842-5.

Rasheed MH, Beevi SS, Geetha A. Enhanced lipid peroxidation and nitric oxide products with deranged antioxidant status in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2007;43(4):333-8.

Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14:47-62.

Renault MA, Roncalli J, Tongers J et al. Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(3):490-8.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105-11.

Richard V, Pillai MR. The stem cell code in oral epithelial tumorigenesis: The cancer stem cell shift hypothesis. *Biochim Biophys Acta* 2010 ;1806(2):146-62

Riobo NA, Lu K, Emerson-Jr CP. Hedgehog signal transduction- signal integration and cross talk in development and cancer. *Cell Cycle.* 2006;5(14):1612-15.

Roberts WG, Palade Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *GE.J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 6):2369-79.

Rodriguez, T et al. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol.* 2004; 40: 207-13.

Rowitch DH, S-Jacques B, Lee SM et al. Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J. Neurosci.* 1999;19(20):8954-65.

Ruiz I, Altaba A. Pattern formation in the vertebrate neural plate. *Trend Neurosci.* 1994;17(6):233-43.

Ruiz I Altaba. The works of GLI and the power of Hedgehog. *Nat Cell Bio.* 1999;1 (6):E147-8.

Sauter ER, Nesbit M, Watson JC et al. Vascular endothelial growth factor is a marker of tumour

invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:775–82.

Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabéu C et al. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem.* 2002;277(46):43799-808.

Schneider S, Thurnher D, Kloimstein P et al. Expression of the Sonic hedgehog pathway in squamous cell carcinoma of the skin and the mucosa of the head and neck. *Head Neck.* 2011;33(2):244-50.

Shao Z, Wen-Feng Z, Xin-Ming C et al. Expression of EphA2 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue: Correlation with the angiogenesis and clinical outcome. *Oral oncol.* 2008;44:1110-17.

Sinicrop FA, Hart J, Michelassi F et al. Prognostic value of bcl-2 oncoprotein expression in stage II colon carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1995;1(10):1103-10.

St-Jacques B, Dassule HR, Karavanova I et al. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol.* 1998;8(19):1058-68.

Shang ZJ, Li ZB, Li JR. VEGF is up-regulated by hypoxic stimulation and related to tumour angiogenesis and severity of disease in oral squamous cell carcinoma: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2006;35:533–538.

Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology* 2005;46:481-89.

Shintani S, Chunnan L, Thoru I et al. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2004;40:13–20.

Swelam W, Ida-Yonemochi, H, Maruyama S et al. Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic adenomas: one of the reasons for their poorly vascularized stroma. *Virchows Arch.* 2005;446(6):653-62.

Stone DM, Murone M, Luoh SM et al. Characterization of the human Suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *Journal of Cell Science.* 1999;112:4437-48.

Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983;12(6):418-24.

Tae k, Adel K, El-Naggar et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Microvessel Density in Head and Neck Tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 2000;6(7):2821-8.

Taghavi N, Yazdi I. Type of food and risk of oral cancer. *Arch Iran Med* 2007;10(2):227-32.

Taipale J, Chen JK, Cooper MK et al. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature.* 2000 ;406(6799):1005-9.

Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature.* 2001;411(6835):349-54.

Takenaka K, Kise Y, Miki H. GSK3beta positively regulates Hedgehog signaling through Sufu in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353(2):501-8.

- Thayer SP, Magliano MP, Heiser PW et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003;425(6960):851-56.
- Uehara M, Sano K, Hisazumi I et al. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2004;40:321–325.
- Valković T, Dobrila F, Melato M et al. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch.* 2002;440(6):583-8.
- Vandesompele J, Preter KD, Pattyn F et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology.* 2002;3(7):1-12.
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989;49: 6449-6465.
- Vermeulen PB, Gaparini G, Fox SB et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *European Journal of Cancer.* 2002;30:1564–1579.
- Xie J, Murone M, Luoh SM et al. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 1998;391:90-92.
- Waltherhouse DO, Yoon J, Iannaccone PM. Developmental pathways: Sonic Hedgehog-Patched-Gli. *Environ Health Perspect.* 1999;107:167-171.
- Wang, L.H.; Choi, Y.L.; Hua, X.Y et al. Increased expression of sonic hedgehog and altered methylation of its promoter region in gastric cancer and its related lesions. *Mod Pathol* 2006;19:675-83.
- Wetmore C. Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models. *Curr Opin Genet Dev.* 2003;13(1):34-42.
- Yamazaki M, Nakamura k, Mizukami Y et al. Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. *Cancer Sci.* 2008;99(6):1131-38.
- Yan M, Wang L, Zuo H et al. HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2011;47(6):504-9.
- Yang Y; Ge JP; Zhou ZT. Effects of thalidomide on DMBA-induced oral carcinogenesis in hamster with respect to angiogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2009;38:455–462
- Yao Y, Pan Y, Chan J et al. Endoglin (CD105) Expression in Angiogenesis of Primary Hepatocellular Carcinomas: Analysis using Tissue Microarrays and Comparisons with CD34 and VEGF. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 2007;37(1):39-48.
- Yasuo O, Ueno H, katagiri et al. Experimental study of antiangiogenic gene therapy targeting VEGF in oral cancer. *Odontology.* 2010;98:52–59.
- Yauch R, Gould S, Scales SJ et al. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature.* 2008;455:406-11.