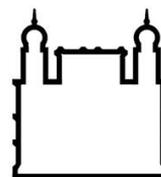




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**IDENTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS E PROTEÍNAS GLIPICANS 1, 3 E 5 EM
CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA: ASSOCIAÇÃO COM MOLÉCULAS
HEDGEHOG E VEGFA**

CAROLINE BRANDI SCHLAEPFER SALES

**Salvador-Bahia-Brasil
2015**

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**IDENTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS E PROTEÍNAS GLIPICANS 1, 3 E 5 EM
CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA: ASSOCIAÇÃO COM MOLÉCULAS
HEDGEHOG E VEGFA**

CAROLINE BRANDI SCHLAEPFER SALES

Orientadora: Prof. Dr^a. Clarissa Araújo Gurgel Rocha

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Patologia
Humana para obtenção do grau de
Doutor.

**Salvador-Bahia-Brasil
2015**

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

S163i Sales, Caroline Brandi Schlaepfer
Identificação dos transcritos e proteínas glicans 1, 3 e 5 em carcinoma escamocelular de boca: associação com moléculas Hedgehog e Vegfa. / Caroline Brandi Schlaepfer Sales.- Salvador, 2015.
70 f.; 30 cm

Orientadora: Prof. Dr^a. Clarissa Araújo Gurgel Rocha, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.
Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.

1. Carcinoma de células escamosas 2. Hedgehog 3. Glipecan I. Título

CDU 616-006.6

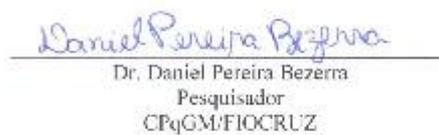
"IDENTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS E PROTEÍNAS GLIPLICANS 1, 3 E 5 EM CARCINOMA ESCAMOLECULAR DE BOCA: ASSOCIAÇÃO COM MOLÉCULAS HEDGEHOG E VEGFA".

CAROLINE BRANDI SCHLAEPFER SALES

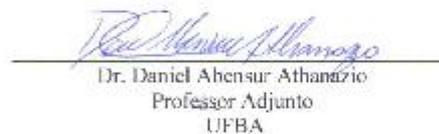
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA


Dra. Marcilei Eliza Cavicchioli Buim
Professora
UNINOVE


Dr. Daniel Pereira Bezerra
Pesquisador
CPqGM/FIOCRUZ


Dr. Jean Nunes dos Santos
Professor Associado
UFBA


Dr. Daniel Abensur Athanzio
Professor Adjunto
UFBA


Dra. Charissa Araújo Gurgel Rocha
Pesquisadora
CPqGM/FIOCRUZ

A minha mãe Iola,

Que sempre me escuta, aconselha e participa ativamente em todas as etapas da minha caminhada. Obrigada por me apoiar e sempre confiar em mim, não sei o que faria se não fosse você para cuidar de mim.

Aos meus irmãos Camila e Heron,

Pela paciência, apoio e por confiar no meu potencial, por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu pai (*in memoriam*) Heron,

Que é meu exemplo, me ensinou a importância de buscar o conhecimento. Sei que mesmo ausente fisicamente, está compartilhando a felicidade deste momento comigo.

A meu marido Bruno,

Por acreditar em mim, ser sempre presente e amigo. Obrigada por ser paciente, nos momentos de nervosismo ou de ansiedade, você soube me acolher. Te amo!!

A minha orientadora Clarissa Gurgel,

Mais que uma orientadora, Clara é uma grande amiga! Obrigada por acreditar no meu potencial, mesmo quando eu ainda acho que não estou preparada! Sinto-me privilegiada por ter uma orientadora que acompanhou todos os meus passos, que me motivou, me desafiou e sempre pensou no melhor para mim. Conviver com Dra. Clarissa, uma profissional que ama o que faz, é no mínimo contagiante e instigante.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Por iluminar minha caminhada, me dar forças e energia para trilhar este caminho.

Aos meus avós,

Obrigada pelo amor, pela confiança, pelos conselhos e por compreender minha ausência, entender o quanto preciso me dedicar e sempre me apoiar!!!

A todos da família,

Por torcerem por mim, acreditarem em mim, sempre me incentivando e lógico, alegrando!

Às meninas,

Debby, Taty, Tynha, Carol, Rana, Mile e Cris, que me acompanham desde a adolescência. Tenho sorte de ter amigas tão especiais como vocês.

Às Guels,

Alineide, Saminha, Lari e Renatinha, tive a oportunidade de conhecê-las na faculdade, e apesar de trilharmos caminhos diferentes, sempre estão presentes, torcendo e vibrando comigo a cada conquista!!!

A Lud e Ro,

Vocês são mais do que especiais, vestiram a camisa comigo, não tenho palavras para definir o quanto agradeço a vocês pelo apoio, amizade, cumplicidade e confiança.

A todos os bolsistas de Iniciação Científica,

Pela dedicação e prazer em nos ajudar, especialmente Vanessa, Raiza, Letícia e Paula, pois tiveram papel mais ativo neste trabalho. Àqueles bolsistas que hoje não estão mais no grupo, como Cecília, Robson e Milena, mas eu que tive a oportunidade de participar da construção dos seus trabalhos, obrigada!

À Profa. Dra. Deise Vilas Boas,

Sempre me recebeu de braços abertos, agradeço pelo incentivo na carreira docente e pela parceria junto ao Hospital Aristides Maltez, contribuindo para a realização deste trabalho.

Ao ICS,

Aos professores por me acolherem, especialmente àqueles que dividi disciplina, Pofa. Deborahaci, Silvana, Deise e Clarisse. Ao secretário Paulo, sempre tão prestativo. E aos meus alunos, que reafirmam a paixão pela docência, especialmente os monitores, Camila, Ruan, Margarete, Danielle, Rafael, Geiza, Silvana, Manoela Gilmar e Ana Paula.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos,

Obrigada pela atenção, calma e paciência, sempre que preciso é gentil e está disponível para ajudar.

Ao Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos,

Por ser parceiro e colaborador, fazendo parte do grupo me possibilitou o aprendizado e o crescimento profissional.

À Dra. Simone Duarte,

Tive a oportunidade trabalhar sob sua orientação, obrigada pela atenção, cuidado e confiança. Foi um período de grande aprendizado, pois estive ao lado de uma profissional muito competente e comprometida com a pesquisa.

À Dra. Patrícia Corby,

Obrigada por me acolher, me incentivar e confiar no meu potencial.

À Beca, Ramile, Heli, Cristina, Denise e Jú,

Amizades que construí no período do doutorado sanduíche, obrigada pelo companheirismo, apoio e carinho. Espero que essa parceria continue!!

À NYU,

Pela estrutura e suporte que recebi durante o doutorado sanduíche, especialmente ao Bluestone e Basic Science & Craniofacial Biology Department.

Aos professores da pós-graduação,

Pelo conhecimento e oportunidade de entender melhor o mundo da pesquisa.

Ao LPBM,

Em especial, Dr. Mitermayer, Dr^a Eliana, Cleiton e Rosane, sempre disponíveis a ajudar.

A toda equipe da Histotecnologia e Microscopia Eletrônica do CPqGM,

Pela contribuição na obtenção das lâminas e fotografias.

A toda equipe de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Aristides Maltez,

Pela imensa contribuição na obtenção da amostra.

À coordenação de ensino,

Que me ajudam a resolver todas as minhas angústias e estão sempre disponíveis para tirar minhas dúvidas.

À Biblioteca do CPqGM,

Pela atenção e presteza.

À UFBA,

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

À Capes e FAPESB,

Pelo apoio financeiro.

Ao CPqGM,

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

SALES, Caroline Brandi Schlaepfer. Identificação dos transcritos e proteínas glipicans 1,3 e 5 em carcinoma escamocelular de boca: associação com moléculas hedgehog e vegfa. 70 f. il. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Via Hedgehog (HH) está ativada em algumas neoplasias humanas, incluindo o Carcinoma Escamocelular de Boca (CEB), o qual corresponde a mais de 95% dos casos diagnosticados na cavidade bucal. Os glipicans (GPC) participam como reguladores desta cascata, atenuando (GPC1 e GPC3) ou regulando positivamente (GPC5) a via HH. **OBJETIVO:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão dos genes GPC1, 3 e 5, associando-os com genes da via HH (SHH, PTCH1 e SMO) e VEGFA, bem como caracterizar a imunexpressão das proteínas GPC, em CEB. **MATERIAL E MÉTODOS:** Trinta e um casos de CEB foram submetidas a reações de qPCR para os genes SHH, PTCH1, SMO, VEGFA, GPC1, 3 e 5. O RNA total foi extraído utilizando uma coluna composta por membrana de sílica (Rneasy Mini Kit). O DNA complementar foi obtido com auxílio da enzima Superscript Vilo™. As reações de qPCR foram conduzidas no aparelho ViiA™ 7 Real-Time PCR System utilizando o sistema *Taqman*, sendo a quantificação relativa avaliada pelo método comparativo de Cq ($\Delta\Delta CQ$). Vinte e seis CEBs, 9 casos de margens tumorais (MAT) e 4 casos de mucosa bucal não neoplásica (MNN) foram submetidos à reação imuno-histoquímica para as proteínas GPC1, GPC3, GPC5, CD105 e MCM3 utilizando o sistema polimérico Advance™ ou LSAB™. As análises das proteínas GPC1, 3 e 5 foram realizadas de acordo com os parâmetros semi-quantitativos descritos por Gurgel et al. (2008). O número de células MCM3 positivas e de vasos/mm² (microdensidade vascular- MDV) foram avaliados em 5 campos, sendo a mediana de e intervalo de confiança utilizados para agrupar os CEBs em alto e baixo perfil proliferativo (AP e BP) e alta e baixa MDV, respectivamente. A análise estatística foi realizada utilizando *GraphPad Prism* versão 6.03. **RESULTADOS:** Transcritos do gene GPC1 (26; 83,87%); GPC3 (n=22; 70,97%) e GPC5 (n=15; 48,38%) foram observados em CEBs. SHH RNAm foi detectado em 5 CEBs (16,13%). A maioria dos CEBs apresentou expressão gênica de PTCH1 (n=25; 80,6%), SMO (n=26; 83,87%) e VEGFA (n=28; 90,32%). Correlação positiva forte e estatisticamente significativa foi demonstrada para GPC5 e PTCH1 (rs=0,60; p=0,02) e entre PTCH1 e VEGFA (rs=0,69; p=0,0003). Imunomarcagem citoplasmática e membranar de GPC1 foi observada principalmente em epitélio de MNN (n=4; 100%) e MAT (n=9; 100%), enquanto que uma perda de imunomarcagem desta proteína foi detectada no parênquima do CEB. A imunexpressão da proteína GPC3 estava ausente em MNN (n= 4; 100%) e MAT (n=9; 100%). O GPC3 ocorreu na membrana e citoplasma de células do parênquima, observadas principalmente na periferia das ilhas tumorais, predominando o escore 3+ (n=5; 19,23%) entre os CEBs positivos (n=23; 88,46%). Ausência de imunomarcagem de GPC5 foi observada em MNN (n=4; 0%) e apenas 2 espécimes de MAT (n=2; 22,22%) apresentaram baixa imunexpressão, escore 1+. GPC5 citoplasmático em células tumorais positivas predominou o escore 1+ (n=5; 38,46%). Ao mesmo tempo, GPC5 foi detectado em estroma de 13 (50%) CEBs, especialmente em células endoteliais e semelhantes a fibroblastos. A expressão dos genes avaliados foi similar em tumores com AP e BP, assim como foi independente da MDV. **CONCLUSÕES:** A correlação entre os transcritos GPC5 e PTCH1, bem como a superexpressão das proteínas GPC5 e GPC3 e perda de imunopositividade de GPC1 são consistentes com a participação destas proteoglicanas como reguladoras da via HH em CEB. O perfil de expressão do gene e proteína GPC1 sugere que este glipican pode participar da biologia tumoral como uma proteína supressora tumoral, enquanto GPC3 e GPC5 participariam oncoproteínas. A presença de GPC5 em estroma tumoral (células endoteliais e fibroblastos) pode estar associada a regulação da via HH neste compartimento do microambiente tumoral.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas, Hedgehog, Glipican.

SALES, Caroline Brandi Schlaepfer. Identificação dos transcritos e proteínas glicicans 1, 3 e 5 em carcinoma escamocelular de boca: associação com moléculas Hedgehog e Vegfa. 70 f. il. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The Hedgehog pathway is activated in some human neoplasms, including Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), which account for more than 95% of all oral cancers diagnosed. Glypicans are involved in the regulation of HH pathway through GPC3 e GPC1 downregulation or/and GPC5 upregulation. **AIM:** The aim of this study was to evaluate the expression profile of GPC1, 3 and 5 genes, correlating to HH and VEGFA gene, even as to characterize the immunoexpression of these proteins at OSCC. **MATERIAL AND METHODS:** A total of 31 cases of OSCC were assessed by qPCR for the SHH, PTCH1, SMO, VEGFA, GPC1, GPC3 and GPC5 genes. The total RNA were extracted using silica membrane column (Rneasy Mini Kit). Complementary DNA was obtained using of Superscript™ Vilo enzyme. The qPCR reactions were performed in VIIA™ 7 Real-Time PCR System using the Taqman enzyme, and relative quantification (RQ) was evaluated by the comparative method of Cq ($\Delta\Delta Cq$). Immunohistochemical reactions for GPC1, GPC3, GPC5, MCM3 and CD105 proteins was performed on twenty-six OSCC, 9 cases of tumor margins (TM) and 4 cases of non-neoplastic oral mucosa (NNM) using Advance™ or LSAB™ system. The analysis of GPC1, 3 and 5 proteins were conducted according to the semi-quantitative parameters described by Gurgel et al. (2008). The number of MCM3 positive cells and vessels/mm² (microvessel density -MVD) were evaluated in 5-matching areas, and the median and confidence interval being used to group the OSCC in high and low proliferative profile (HP and LP) and high and low MDV, respectively. Statistical analysis were carried out with GraphPad Prism v.6.03. **RESULTS:** Transcripts of GPC1 (26; 83.87%), GPC3 (n=22; 70.97%) and GPC5 (n=15; 48.38%) genes were observed in OSCC. SHH mRNA was detected in 5 OSCC (16:13%), PTCH1 gene in 25 CEBs (80.6%), SMO in 26 (83.87%) and VEGFA in 28 (90.32%). Strong and statistically significant positive correlation was demonstrated for GPC5 and PTCH1 genes (rs=0.60; p= 0.02) and PTCH1 and VEGFA transcripts (rs = 0.69; p = 0.0003). Cytoplasmic and membrane immunostaining of GPC1 was mainly observed in epithelial MNN (n = 5; 100%) and MAT (n=9; 100%), while a reduction of this protein was detected in parenchymal cells. GPC3 protein were absent in MNN (n = 4; 0%) and MAT (n=9; 0%). The GPC3 occurred in the membrane and cytoplasm of parenchymal cells, mainly observed in the periphery of the tumor islands and the 3+ score was predominant (n=3; 11:56%) in positive OSCC. GPC5 positive tumor cells occurred in the cytoplasm, scored 1+ (n = 5; 38.46%). In addition, GPC5 was detected in the stroma of 13 (50%) OSCC, especially in endothelial and fibroblast cells. The gene expression was similar in tumors with HP and LP, and was independent of MDV. **CONCLUSIONS:** The correlation between the GPC5 and PTCH1 transcripts, as well the overexpression of GPC5 and GPC3 protein and the loss of GPC1 positive cells are consistent with the participation of these proteoglycans as regulators of HH pathway in OSCC. The gene and protein expression profile of GPC3 indicate that this proteins participates in tumor biology as a tumor suppressor protein, while GPC5 and GPC3 function as oncoproteins. The presence of GPC5 in tumor stroma (endothelial cells and fibroblasts) could be associated with the regulation of the HH pathway in this compartment of the tumor microenvironment.

Key words: Carcinoma, Hedgehog, Glypican.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes e o funcionamento da via Hedgehog em humanos.	22
Figura 2. Efeitos opostos de GPC3 e GPC5 na Via de sinalização HH	28
Figura 3. Demonstração dos genes referências ACTB, B2M e UBC na amostra de CEB.	37
Figura 4. Expressão gênica de <i>SMO</i> em CEBs com invasão e sem invasão de linfonodos.	46
Figura 5. Expressão gênica de <i>VEGFA</i> em CEBs T1-T2 e T3-T4.	47
Figura 6. Perfil de expressão dos genes <i>SHH</i> , <i>PTCH1</i> , <i>SMO</i> , <i>GPC1</i> , <i>GPC3</i> , <i>GPC5</i> e <i>VEGFA</i> .	48
Figura 7. Correlação entre <i>PTCH1</i> e <i>GPC5</i> .	50
Figura 8. Correlação entre <i>PTCH1</i> e <i>VEGFA</i> .	50
Figura 9. Padrão e distribuição da proteína GPC1 em Mucosa Não-neoplásica (MNN), Mucosa Adjacente ao Tumor (MAT) e Carcinoma Escamocelular Bucal (CEB).	54
Figura 10. Padrão e distribuição da proteína GPC3 em Mucosa Não-neoplásica (MNN), Mucosa Adjacente ao Tumor (MAT) e Carcinoma Escamocelular Bucal (CEB).	55
Figura 11. Padrão e distribuição da proteína GPC5 em Mucosa Não-neoplásica (MNN), Mucosa Adjacente ao Tumor (MAT) e Carcinoma Escamocelular Bucal (CEB).	56
Figura 12. Dupla-marcação para as proteínas SHH/GPC3, SHH/GPC5 e GLI1/GPC5 em CEB.	58
Figura 13. Níveis de expressão de GPC1, GPC5 e VEGFA em tumores com baixa e alta MDV.	59
Figura 14. Expressão dos genes <i>PTCH1</i> e <i>SMO</i> em CEBs de alto e baixo perfil proliferativo.	60
Figura 15. Expressão dos genes <i>GPC3</i> e <i>GPC5</i> em CEBs de alto e baixo perfil	60

proliferativo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios utilizados para gradação de CEBs.	35
Tabela 2. Dados do fabricante, clone, recuperação antigênica e diluição dos anticorpos.	39
Tabela 3. Características clínicas e histológicas dos CEBs.	45
TTTa Tabela 4. Associação entre a expressão do gene <i>SHH</i> , parâmetros clínicos e histológicos.	46
Tabela 5. Associação dos genes <i>PTCH1</i> , <i>SMO</i> , <i>GPC1</i> , <i>GPC3</i> , <i>GPC5</i> e <i>VEGFA</i> segundo parâmetros clínicos e morfológicos.	49
Tabela 6. Correlações entre os genes <i>SHH</i> , <i>PTCH1</i> , <i>GPC1</i> , <i>GPC3</i> , <i>GPC5</i> e <i>VEGFA</i> .	51
Tabela 7. Avaliação das proteínas GPC1, GPC3 e GPC5 no parênquima e GPC5 no estroma de CEB, segundo parâmetros clínicos e histológicos.	53
Tabela 8. Distribuição dos escores das proteínas GPC3 e GPC5 no parênquima e estroma de CEB.	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

18S	Refere-se ao gene da Sub-unidade menor de ribossomos de seres eucarióticos
ACTB	Refere-se ao gene Beta-actin
AP	Alto perfil proliferativo
BP	Baixo perfil proliferativo
B2M	Refere-se ao gene β 2 microglobulin
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
cDNA	DNA complementar
CEB	Carcinoma Escamocelular Bucal
DEO	Displasia epitelial oral
DHH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Desert Hedgehog</i>
DM	Densidade de macrófagos
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNase	Deoxyribonuclease
FU	Refere-se ao gene ou proteína <i>Fused</i>
GAPDH	Refere-se ao gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLI	Refere-se ao gene <i>Glioma-associated oncogene</i>
GLI_R	Formas repressoras da proteína GLI
GPC	Refere-se a Glipicans
GPC1	Proteína codificada pelo gene <i>GPC1</i>
GPC1	Refere-se ao gene Glipican 1
GPC3	Refere-se ao gene Glipican 3
GPC3	Proteína codificada pelo gene <i>GPC3</i>
GPC5	Refere-se ao gene Glipican 5
GPC5	Proteína codificada pelo gene <i>GPC5</i>
GPI	Âncora de glicosilfosfatidilinositol
HH	Hedgehog
HPRT1	Refere-se ao gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HHIP	Refere-se ao gene <i>Hedgehog-interacting protein</i>
HRP	Do inglês, <i>Horse Raddish Peroxidase</i>
HSPG	Proteínas de Heparan Sulfato
IHH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Indian Hedgehog</i>

Ki-67	Refere-se ao antígeno Ki-67 ou anticorpo de mesmo nome
LRP1	Refere-se a proteína Low-density-lipoprotein receptor related protein-1
MAT	Margem tumoral
MCM3	Minichromosome maintenance complex component 3
MDV	Microdensidade vascular
MNN	Mucosa não-neoplásica
PTCH1	Refere-se ao gene <i>Patched 1</i>
PTCH1	Refere-se a proteína <i>Patched 1</i>
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
R²	Coefficiente de Correlação de Pearson
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuclease
RNA_m	RNA mensageiro
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
SCBCN	Refere-se à Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide
SHH	Refere-se à proteína <i>Sonic Hedgehog</i>
SHH	Proteína <i>Sonic Hedgehog</i>
SMO	Gene ou proteína <i>Smoothened</i>
SUFU	Gene ou proteína <i>Supressor of Fused</i>
SSGB	Refere-se à Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel
TNM	Do inglês, <i>Tumor lymph nodes metastasis</i>
VEGFA	Refere-se ao gene Vascular endotelial growth fator A
VEGFA	Refere-se a proteína Vascular endotelial growth fator A
WNT	Wingless Type

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	CARCINOMA ESCAMOCELULAR BUCAL	18
2.2	VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG (HH)	20
2.3	GLIPLICANS (GPC)	24
2.4	ANGIOGÊNESE	28
3	HIPÓTESE	31
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVO GERAL	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	33
5.3	ESTUDO HISTOLÓGICO	34
5.4	ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA	35
5.4.1	Isolamento de Rna Total e Transcrição Reversa (RT-PCR)	35
5.4.2	Reações de PCR em Tempo Real- Qpcr	36
5.4.3	Análise da Expressão Gênica	37
5.5	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	38
5.6	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	39
5.7	DUPLA-MARCAÇÃO	40
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6	RESULTADOS	44
6.1	ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS DO CEB	44
6.2	EXPRESSÃO DE GENES HH E GPC	45
6.3	CORRELAÇÃO ENTRE GENES HH E GPC	50
6.4	IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS GPC1, 3 E 5 EM MNN, MAT E CEB	51
6.5	DUPLA-MARCAÇÃO EM CEB	57
6.6	GENES <i>GPC1</i> , <i>GPC5</i> E <i>VEGFA</i> E MDV	59
6.7	GENES HH, GPCS E POTENCIAL PROLIFERATIVO	59
7	DISCUSSÃO	60
8	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer de boca é um problema de saúde pública e o sexto tumor mais freqüente no mundo (JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011), sendo que o Carcinoma Escamocelular Bucal (CEB) é o subtipo histológico mais comum de câncer de boca e corresponde a cerca de 95% dos casos diagnosticados (JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011; LAMBERT et al., 2011; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013). Mesmo com os avanços no conhecimento sobre a patogênese desta doença, ainda há grande dificuldade em determinar os genes iniciadores deste tipo tumoral, prever como os CEB progridem e o prognóstico é estabelecido, considerando-se o tamanho do tumor, sítios anatômicos envolvidos, gradação histológica e comprometimento de linfonodos (MÉNDEZ et al., 2002).

Vias de sinalização que participam do desenvolvimento embrionário são normalmente mantidas em estado inativo em tecidos não-neoplásicos adultos e a re-ativação destas pode resultar em desenvolvimento tumoral (AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012) destacando-se, neste contexto, a via *Hedgehog* (HH). Estudos já demonstraram que esta cascata tem importante papel na patogênese de tumores, como câncer do trato gastrointestinal (KATOH; KATOH, 2009), de pâncreas (THAYER et al., 2003), próstata (CHARI; MCDONNELL, 2007) e CEB (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011; HONAMI et al., 2012; LEOVIC et al., 2012) especialmente por participar da ativação de programas relacionados a proliferação e sobrevivência celular, além da manutenção células-tronco tumorais (CHARI; MCDONNELL, 2007; RIOBO; HAINES; EMERSON, 2006).

Glipicans (GPC) são proteoglicanos que estão presente na membrana plasmática e que participam da regulação de várias vias de sinalização, como a HH, *Wingless Type* (WNT) e *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) (FILMUS; CAPURRO, 2008). Existem seis tipos de

GPCs em mamíferos, sendo que os GPC 1, 3 e 5 despertam especial interesse no estudo de tumores malignos (FILMUS; CAPURRO, 2014). A superexpressão de GPC1 está bem descrita em carcinoma pancreático (DUAN et al., 2013), enquanto que GPC3 é considerado um marcador prognóstico em hepatocarcinoma (CAPURRO et al., 2003; HIPPO, 2004; NING et al., 2012; SHIRAKAWA et al., 2009a) e melanoma (KANDIL et al., 2009; NAKATSURA et al., 2004). Em outros tumores, como de mama, de ovário e de mesotélio, esta molécula parece atuar como supressora tumoral (LIN et al., 1999; XIANG; LADEDA; FILMUS, 2001). Já o GPC5 está superexpressa em gliomas e rabdomiossarcomas (GARCÍA-SUÁREZ et al., 2014; LI et al., 2011; WILLIAMSON et al., 2007).

Considerando-se a participação de glipicans como reguladores da via HH, GPC1 e GPC3 atenuam a atividade da cascata HH, através dos sinais para degradação do morfógeno SHH (CAPURRO et al., 2008; FILMUS; CAPURRO, 2014; WILSON; STOECKLI, 2013), enquanto GPC5 aumenta a afinidade entre SHH e o receptor PTCH1, estimulando a atividade sinalizadora (FILMUS; CAPURRO, 2014; LI et al., 2011).

Diante dos resultados preliminares do nosso grupo (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011; SALES, 2012; VALVERDE, 2015) e sabendo-se do papel de glipicans na regulação da via HH, bem como considerando a função destas biomoléculas como oncogenes ou genes supressores tumorais em neoplasias malignas humanas, sendo este o primeiro trabalho com o objetivo de estudar a expressão dos genes e proteínas GPC1, GPC33 e GPC5 em CEB, bem como avaliar a associação destes glipicans com moléculas da via HH e VEGFA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR BUCAL

O câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo, sendo considerado um problema de saúde pública mundial. Estimativas da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) apontaram que ocorreriam, no mundo, cerca de 320 mil casos novos e 157 mil óbitos, para o ano de 2015, por câncer de boca e lábio, sendo que 80% desses em países em desenvolvimento.

Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2015, 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres, o que corresponde a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de boca, em homens, é o 4º mais frequente na região Nordeste (n= 1960; 7,16/100 mil), enquanto que, para as mulheres, é o 9º (n= 1060; 3,72/ 100 mil). Adicionalmente, a Bahia é o estado responsável pelo maior número de casos da região Nordeste, ocupando o 6º lugar na prevalência de todo o país (Brasil, INCA, 2014).

Em relação ao subtipo histológico, o CEB é o tipo mais frequente, correspondendo a 95% dos casos diagnosticados (BHARGAVA, SAIGAL, CHALISHAZAR, 2010; JEMAL et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014). O CEB é uma neoplasia epitelial invasiva com graus variáveis de diferenciação escamosa e uma propensão à invasão metastática precoce e extensa de linfonodos. Ocorre predominantemente em adultos na faixa etária da 5ª a 6ª décadas de vida, sendo os principais fatores de risco associados o tabaco e o álcool (HUNTER; PARKINSON; HARRISON, 2005; JOHNSON; FRANCESCHI; FERLAY, 2005), além de infecções pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) e fatores genéticos (CALIFANO et al., 1996; HERRERO, 2003).

Clinicamente, o CEB pode se apresentar como uma placa eritematosa, um nódulo ou ainda como uma úlcera, podendo ou não estar associada a dor, disfagia, odinofagia, dificuldades da fala, sangramentos, perda de peso ou odor bucal (JOHNSON; FRANCESCHI; FERLAY, 2005). Os sítios mais acometidos por esta neoplasia são os dois terços anteriores da língua, assoalho bucal, palato duro, mucosa jugal, região retromolar e gengiva, nesta ordem (LAMBERT et al., 2011). Muitas lesões de CEB são assintomáticas ou podem apresentar sintomas com achados clínicos mínimos. Dessa forma, a maioria dos pacientes já tem a apresentação de sinais e sintomas de doença localmente avançada no momento do diagnóstico, podendo evoluir com áreas de necrose e extensão para estruturas adjacentes como ossos, músculos e pele (JOHNSON; FRANCESCHI; FERLAY, 2005).

O CEB tem um aspecto histológico amplo e, a partir destas alterações, o tumor pode ser graduado em bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado. O grau histológico atribuído ao tumor pode estar associado com o prognóstico do paciente, sendo que quanto menor o grau de diferenciação celular, pior o prognóstico do paciente (JOHNSON; FRANCESCHI; FERLAY, 2005; MÉNDEZ et al., 2002). Além da graduação histológica, é necessário também estadiar clinicamente o tumor a fim de descrever a extensão anatômica da lesão (SOBIN; WITTEKIND, 2002), bem como avaliar a ocorrência de metástase e comprometimento de estruturas adjacentes (CLATOT et al., 2014).

O sistema de estadiamento clínico utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Este sistema baseia-se em 3 componentes: T, extensão do tumor primário; N, a presença ou ausência de metástases para linfonodos regionais; e M, para presença ou ausência de metástase à distância. Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, N0 a N3 e M0 a M1. Seguindo o TNM, os tumores são agrupados em estadios clínicos que podem

variar de I ao IV. Nos estádios I e II, os tumores são, respectivamente, T1 e T2, não apresentam metástase em linfonodos regionais (N0) e nem à distância (M0). Os tumores T3 ou aqueles T1 e T2 com 1 linfonodo regional invadido (N1) são considerados estágio III. Lesões classificadas como T4, ou aquelas que apresentam 2 linfonodos regionais invadidos (N2) e todos os tumores que apresentam metástase à distância (M1), são considerados estágio IV (SOBIN; WITTEKIND, 2002).

O tratamento dos CEBs depende da localização, da extensão do tumor primário, da gradação histológica e do status dos linfonodos cervicais. A cirurgia é o principal tratamento para ressecção dos tumores primários e deve sempre incluir toda lesão tumoral e margem de tecido livre de tumor em todas as dimensões (mínimo de 1,0cm de margem) (BRASIL, INCA, 2014). Este tratamento cirúrgico pode ser associado à radioterapia em estágios mais avançados da doença, e também a quimioterapia para controle de metástase locoregional ou à distância, ou ainda, em casos recorrentes (GOLD; LEE; KIM, 2009).

O tratamento do CEB ainda está associado a uma alta morbidade e pode resultar em dificuldades na fala, distúrbios na deglutição e mastigação, deformidades estéticas 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 anatômicos nobres, gradação histológica e envolvimento de linfonodos (CLATOT et al., 2014; MÉNDEZ et al., 2002).

2.2 A VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG (HH)

A via de sinalização Hedgehog (HH) exerce um papel fundamental no crescimento e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário de vários órgãos

(HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012) como dentes (HARDCASTLE; HUI; SHARPE, 1999), pulmões (GRINDLEY et al., 1997), cólon, mama, esôfago (INGHAM; MCMAHON, 2001), próstata, estômago (CHARI; MCDONNELL, 2007), sistema nervoso (WETMORE, 2003) e pâncreas (THAYER et al., 2003). Além da sua participação na embriogênese, a via HH também desempenha um papel na manutenção e crescimento de células-tronco adultas (RUIZ I ALTABA; SÁNCHEZ; DAHMANE, 2002), reparo tecidual (ASAI et al., 2006) e carcinogênese (CHARI; MCDONNELL, 2007; RUIZ I ALTABA; SÁNCHEZ; DAHMANE, 2002; YANG et al., 2010)

Os componentes e o funcionamento da via HH foram inicialmente descritos em estudos com *Drosophila* (GOODRICH, 1997). Em humanos, os componentes centrais da via HH consistem nos três ligantes, *Sonic Hedgehog* (SHH), *Desert Hedgehog* (DHH) e *Indian Hedgehog* (IHH) (INGHAM; MCMAHON, 2001); receptor transmembrânico *Patched 1* (PTCH1); a proteína reguladora positiva *Smoothened* (SMO) e os fatores de transcrição da família *Glioma-associated oncogene* (GLI1, GLI2 e GLI3) (STONE et al., 1999).

A atividade da via HH ocorre no cilium primário, uma organela de forma microtubular que se estende da membrana plasmática, que age como uma “antena” que detecta sinais extracelulares e transmite estes sinais para o núcleo, a fim de gerar uma resposta celular (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012). A ativação clássica da via HH ocorre quando há interação do ligante HH com PTCH1, o receptor transmembrânico é deslocado do cilium, permitindo, desta forma, o acúmulo de SMO e sua consequente ativação. A ativação de SMO transduz o sinal de SHH para o citoplasma, culminando na translocação nuclear da forma ativadora de GLI e consequente indução da expressão de genes alvo da via HH (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012), envolvidos em proliferação e diferenciação celular (por exemplo, Ciclina D1 e D2, N-myc, Wnts, PDGFR, IGF2, FoxM1,

Foxa2, Nkx2.2, FoxF1, Myf5, HES1, IGFBP3); sobrevivência (Bcl2); auto-renovação (Bmi1, Nanog); angiogênese (VEGF); transição epitelial-mesenquimal (Snail1, SIP1, Elk1 e Msx2) e invasão (osteopontina) (HOOPER; SCOTT, 2005; STECCA; RUIZ I ALTABA, 2010).

Na ausência de ligante HH, PTCH1 localiza-se no interior do cilium primário e promove a supressão da atividade de SMO, impedindo a translocação desta proteína. Conseqüentemente, os fatores de transcrição GLI são mantidos no citoplasma por um complexo repressor composto por diversas proteínas, como *Supressor of Fused* (SUFU) e *Fused* (FU) (AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012). As formas repressoras de GLI (GLI_R) dependem de clivagem via ubiquitina-proteassomo antes da translocação para o núcleo, onde irão impedir a transcrição de genes alvo da via HH. Já o GLI1, o qual não possui o domínio repressor N-terminal, não necessita de clivagem prévia e funciona exclusivamente como ativador da via (COHEN, 2012). A ativação da via HH no contexto do cilium primário está ilustrada esquematicamente na Figura 1.

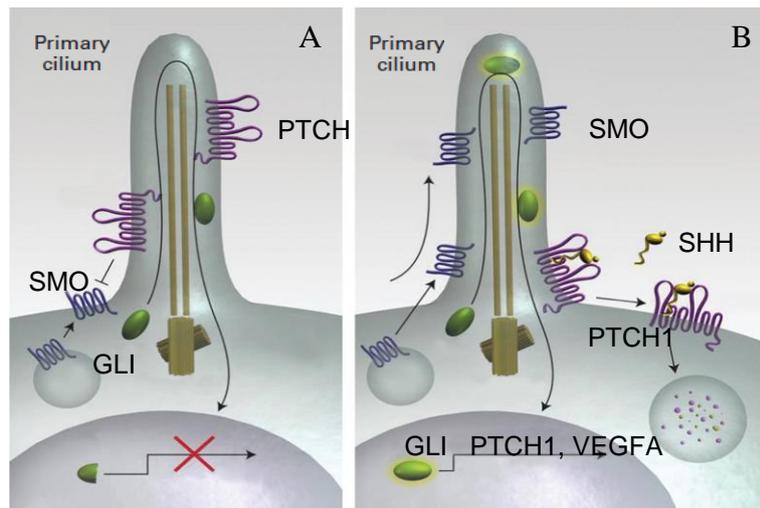


Figura 1. Componentes e o funcionamento da via Hedgehog em humanos. (a) Na ausência do ligante SHH, PTCH1 localiza-se no cílio e inibe a atividade de SMO. O fator de transcrição GLI é mantido no citoplasma (b) Na presença do ligante, PTCH1 é translocado do cílio, permitindo o acúmulo ciliar de SMO, o qual promove uma cascata sinalizadora que resulta na translocação da forma ativadora de GLI para o núcleo, onde ativará genes alvos da via HH. Fonte:(Low e De Sauvage, 2010).

Vias de sinalização que participam do desenvolvimento embrionário são normalmente mantidas em estado inativo em tecidos não-neoplásicos adultos e a re-ativação destas pode resultar em desenvolvimento tumoral (AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012). A participação da via HH na tumorigênese foi demonstrada, inicialmente, em pacientes com carcinomas basocelulares esporádicos e associados à Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide (GOODRICH et al., 1996; HAHN et al., 1996, 1999), mas a ativação desta cascata sinalizadora no desenvolvimento e progressão de outras neoplasias já foi demonstrada no câncer de próstata (KARHADKAR et al., 2004; SANCHEZ; CLEMENT; RUIZ I ALTABA, 2005), câncer de pulmão (VELCHETI; GOVINDAN, 2007; WATKINS et al., 2003), câncer gastrointestinal (BERMAN et al., 2003; KATOH; KATOH, 2005), câncer de mama (MUKHERJEE et al., 2006), câncer de ovário (CHEN et al., 2007), hepatocarcinoma (PATIL et al., 2006; SICKLICK et al., 2006) e boca (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011; HONAMI et al., 2012; LEOVIC et al., 2012).

Os mecanismos da via HH envolvidos na patogênese do CEB ainda não estão bem estabelecidos. Devido ao papel desta via em neoplasias humanas, seus componentes têm sido considerados como potenciais alvos terapêuticos (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; CONI; INFANTE; GULINO, 2013) e pesquisas têm sido direcionadas no sentido de desenvolver drogas, tais como inibidores de SMO e antagonistas de GLI. Nesse contexto, Yan et al.(2011b) avaliou a ação de inibidores da via HH em CEBs, demonstrando que o bloqueio da cascata sinalizadora promove uma diminuição/inibição da proliferação e migração celular e aumento da apoptose nestes tumores.

2.3 GLIPICANS (GPC)

Glipicans (GPC) são proteoglicanos que fazem parte da família de proteínas que possuem Heparan Sulfato (HSPG) e que interage com a membrana plasmática através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (FILMUS; SELLECK, 2001). Durante a embriogênese, os GPCs participam da morfogênese através da regulação de várias vias de sinalização, como a *Hedgehog* (HH), *Wingless Type* (WNT) e *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) (FICO; MAINA; DONO, 2011; SONG et al., 2005; TSUDA et al., 1999). Na espécie humana foram identificados 6 diferentes tipos de GPCs (BAEG et al., 2001; PAINE-SAUNDERS; VIVIANO; SAUNDERS, 1999), com destaque para os subtipos 1, 3 e 5.

A localização em membranas dos GPC permite que estas moléculas participem na estabilização e potencialização de interações entre ligantes e receptores (HÄCKER; NYBAKKEN; PERRIMON, 2005). Em adição, podem funcionar como receptor e co-receptor (CAPURRO et al., 2008), auxiliando na endocitose e degradação de ligantes, contribuindo, dessa forma, para o controle e regulação de cascatas sinalizadoras (INCARDONA; GRUENBERG; ROELINK, 2002; TORROJA; GORFINKIEL; GUERRERO, 2004). A quebra da âncora de lipídio que conecta GPC à membrana plasmática pode resultar em GPC solúveis ou associados a proteínas de baixa densidade, os quais podem desempenhar funções de formas mais amplas (HÄCKER; NYBAKKEN; PERRIMON, 2005; LIN, 2004).

O GPC1 está bem caracterizado como receptor de fatores pró-angiogênicos como angiopoetina 1 e fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) (AIKAWA et al., 2008). De acordo com estes autores, GPC1 pode ser encontrado na superfície de células neoplásicas, células endoteliais e em fibroblastos. Além disso, esta proteína pode aumentar a mobilização de fatores de crescimento no estroma tumoral, melhorando a habilidade de vários

tumores a responder a ação de morfógenos (WHIPPLE; LANDER; KORC, 2008). Na regulação da via HH, GPC1 atua como co-receptor, auxiliando a interação entre o morfógeno e o inibidor *Hedgehog-interacting protein* (HHIP) (WILSON; STOECKLI, 2013).

Em tumores malignos humanos, os estudos que investigam GPC1 ainda são limitados, com resultados consistentes apenas para o câncer de pâncreas (AIKAWA et al., 2008; KLEEFF et al., 1998) e estudos exploratórios em câncer de mama (DING et al., 2005; MATSUDA et al., 2001). Contudo, ainda não são bem conhecidos os mecanismos pelos quais o GPC1 participa do estímulo à proliferação do tumor de pâncreas, bem como quais os mecanismos associados ao acúmulo desta proteína (STEINFELD; VAN DEN BERGHE; DAVID, 1996), mas o bloqueio da atividade de GPC1 ocasiona uma redução do crescimento de células de câncer pancreático (KLEEFF et al., 1998).

O gene GPC3, localizado no cromossomo Xq26, participa da regulação do crescimento celular, diferenciação e migração (FILMUS; CAPURRO, 2008; FILMUS, 2001). Durante o período embrionário altos níveis de GPC3 são encontrados, porém em tecidos adultos sua expressão é variável, ocorrendo, por exemplo, em tecidos mamários, ovariano e mesotélio (CAPURRO et al., 2008; FILMUS; CAPURRO; RAST, 2008). A mutação no gene GPC3 está envolvida no desenvolvimento da Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SSGB) (PILIA et al., 1996), a qual se caracteriza por crescimento excessivo dos tecidos (FILMUS; CAPURRO, 2008; NERI et al., 1998). Entre as manifestações clínicas em pacientes acometidos pela SSGB podem ser observado: fenda palatina, polidactilia, sindactilia, mamilo supranumerário, defeito congênito do coração, hérnia umbilical, displasia e cistos renais. Estudos em camundongos *GPC3-knockout* demonstram inúmeras anormalidades encontradas em indivíduos portadores da SSGB, como a proliferação exagerada e persistente das células epiteliais dos túbulos coletores renais e ureteres (CANO-GAUCI et al., 1999).

Estes achados sugerem que o GPC3 é um regulador da proliferação celular (FILMUS; CAPURRO; RAST, 2008; FILMUS; SELLECK, 2001) e um dos mecanismos relacionados a patogenia desta doença pode ser a ativação aberrante da via HH, ocasionada pela perda de expressão de GPC3 (CAPURRO; LI; FILMUS, 2009; CAPURRO et al., 2008). GPC3 atua como um regulador negativo da via HH através da competição com PTCH1 pelo ligante SHH. Como consequência, há um aumento na degradação deste morfógeno, com reflexos no controle da atividade sinalizadora (CAPURRO et al., 2008). (Figura 2)

Para promover reconhecimento e inibição da via HH, o GPC3 precisa estar ancorado à membrana plasmática, através de GPI (CAPURRO; SHI; FILMUS, 2012b; CAPURRO et al., 2008). Entretanto, ao contrário de outras proteínas com domínio GPI, a endocitose do complexo SHH/GPC3 é mediada pelo receptor LRP1 (Low-density-lipoprotein receptor related protein-1), dependente de clatrina e independentes de *rafts* (CAPURRO; SHI; FILMUS, 2012a).

Em câncer de mama (XIANG; LADEDA; FILMUS, 2001), ovário (LIN et al., 1999), mesotélio (MURTHY et al., 2000) e pulmão (KIM et al., 2003) o GPC3 funciona como supressor tumoral (FILMUS, 2001), sendo detectado baixos níveis de expressão de GPC3. Nestas neoplasias, o mecanismo de silenciamento envolve hipermetilação da região promotora deste gene e não mutação (LIN et al., 1999; MURTHY et al., 2000). Dessa forma, a utilização de agentes demetilantes pode ser uma estratégia para re-estabelecer a expressão do gene GPC3 e, conseqüentemente, inibição do crescimento tumoral (LIN et al., 1999).

Por outro lado, GPC3 tem sido caracterizado como um oncogene em hepatocarcinoma (CAPURRO et al., 2003; HIPPO, 2004; NING et al., 2012; SHIRAKAWA et al., 2009a), carcinoma escamocelular de pulmão (AVIEL-RONEN et al., 2008) e carcinoma gástrico (HISHINUMA et al., 2006), uma vez que altos níveis desta molécula são observados nestes

tumores, sem expressão nos tecidos não-tumorais (FILMUS; CAPURRO, 2014; FILMUS, 2001). O GPC3 representa uma ferramenta diagnóstica e alvo terapêutico para hepatocarcinomas, sendo que aumento de expressão de GPC3 são observados na progressão desta doença e relacionados com uma maior agressividade destes tumores (RUAN et al., 2007; YAN et al., 2011a). Em melanomas, altos níveis de expressão do gene *GPC3* também tem sido associado a progressão desta doença e a proteína desponta como um biomarcador sérico, especialmente quando detectada na fase inicial da doença (NAKATSURA et al., 2004). Nestes tumores, a função oncogênica de GPC3 está relacionada a ativação da via WNT, especialmente pela ação em β -catenina (ZITTERMANN et al., 2010).

Em tecidos adultos, a expressão de GPC5 foi documentada em cérebro, rins, testículos e glândula pituitária (THWAY; SELFE; SHIPLEY, 2012). Esta proteoglicana localiza-se no cilium primário, o que corrobora para a sua participação como reguladora da via HH (LI et al., 2011; WITT et al., 2013). O GPC5 tem afinidade pelo morfógeno SHH e receptor PTCH1 e parece atuar aumentando a afinidade e interação entre estas moléculas, contribuindo para a ativação da cascata sinalizadora (LI et al., 2011). (Figura 2)

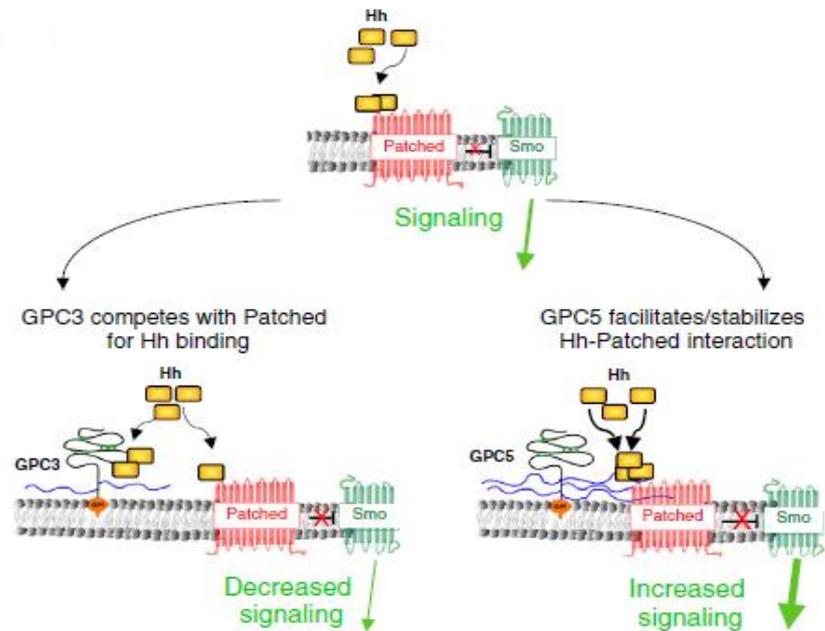


Figura 2. Efeitos opostos de GPC3 e GPC5 na Via de sinalização HH. À esquerda, GPC3 presente na membrana celular é capaz de interagir com HH, mas não com PTCH1, promovendo a diminuição da disponibilidade de morfógenos HH, consequentemente diminuindo atividade da Via HH. À direita, GPC5 presente na membrana celular é capaz de interagir com HH e PTCH1, aumentando a afinidade de interação e estabilizando a ligação de morfógeno e receptor, consequentemente aumentando a ativação da via HH. Fonte: (FILMUS; CAPURRO, 2014)

A participação de GPC5 na biologia tumoral não está completamente elucidada, mas estudos em Rbdomiossarcoma (RMS) indicam que esta molécula é uma oncoproteína (WILLIAMSON et al., 2007), com reflexos no aumento da proliferação celular e em consequência do estímulo da via HH (LI et al., 2011). Por outro lado, uma redução da expressão do GPC5 foi observada em adenocarcinoma pulmonar e câncer de mama, em relação ao tecido normal, sugerindo uma atividade supressora nestas neoplasias (Li e Yang, 2011).

2.4 ANGIOGÊNESE

A compreensão de que a iniciação e progressão de tumores não dependem apenas de eventos mutagênicos em células malignas, mas também das interações entre estroma e parênquima, não é recente (FOULDS, 1964). Nesse contexto, a percepção do câncer deve ser ampliada e compreendida em um contexto de microambiente, onde interagem células

tumorais propriamente ditas, células ditas genotipicamente normais, vasos e substâncias produzidas localmente ou provenientes da irrigação sanguínea (HANAHAN; WEINBERG, 2011; SICA et al., 2006, 2008).

Em 1971, Folkman et al. formularam 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; WICKI; CHRISTOFORI, 2008), secretados por células neoplásicas e/ou inflamatórias adjacentes ao tumor (RAICA, CIMPEAN E RIBATTI, 2009). Uma vez que é através da rede vascular que oxigênio e nutrientes são disponibilizados para as células neoplásicas, percebe-se que a angiogênese é um processo fundamental na manutenção, progressão e metástase tumoral (BERGERS; BENJAMIN, 2003; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O VEGF é o maior regulador positivo da angiogênese fisiológica e associada a processos patológicos, como as neoplasias. Dentre as principais isoformas, destaca-se o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA), citocina que interage preferencialmente com os receptores do fator de crescimento endotelial vascular 1 (VEGFR-1) e 2 (VEGFR-2) (WICKI; CHRISTOFORI, 2008).

Dentre os marcadores endoteliais disponíveis para estudo da angiogênese tumoral, o CD34 e endogлина (CD105) têm se destacado. A proteína CD105 é encontrada em células endoteliais humanas em proliferação, especialmente quando estas estão em condições de hipóxia (MARIONI et al., 2010; SANDLUND et al., 2006), enquanto que a CD34 pode ser encontrada em vasos estáveis, os quais não estão participando do processo angiogênico e, por isso, é mais utilizado como um marcador pan-endotelial (MARIONI et al., 2010). Desta forma, o marcador CD105 se destaca no estudo em neoplasias, uma vez que o mesmo não é observado em vasos pré-existentes e tecido normal (SANDLUND et al., 2006).

A via Hedgehog (HH) apresenta um importante papel na formação de novos vasos sanguíneos (POLA et al., 2001), sendo que, em tumores humanos, a maior expressão de seus componentes influencia o microambiente tumoral e, conseqüentemente, o processo angiogênico (CHEN et al., 2011). Os ligantes da via HH podem induzir a formação de vasos sanguíneos através da secreção de fatores angiogênicos, incluindo o VEGF e angiopoietinas, por células mesenquimais, especialmente após isquemia (HARRIS et al., 2012; OLSEN et al., 2004). Além de modular níveis de moléculas pró-angiogênicas em células estromais, os morfógenos HH também podem influenciar a angiogênese através da via clássica (CHEN et al., 2011).

Seguindo a linha de investigação da angiogênese em neoplasias, sabe-se que o GPC1 é capaz de interagir com o VEGFA e aumentar a afinidade de interação desta molécula com seus receptores (GENGRINOVITCH et al., 1999; JAKOBSSON et al., 2006), além de ser o único GPC cuja expressão já foi documentada em células endoteliais (MERTENS et al., 1992; ROSENBERG et al., 1997). Aikawa et al. (2008) demonstraram, *in vivo*, estudando câncer pancreático em camundongos atímicos, que o bloqueio de GPC1 ocasionou diminuição da MDV, assim como dos níveis de *VEGFA* RNAm.

3 HIPÓTESES

H1- Os genes e proteínas GPC5 estão superexpressos em CEB e há uma correlação entre a expressão destes genes com os níveis de SHH, PTCH1 e SMO.

H2- O gene e proteína GPC1 e GPC3 são subregulados em CEB e há uma correlação inversa com os níveis dos genes SHH, PTCH1 e SMO.

H3- Há uma correlação entre os níveis de GPC1 e PTCH1 com o VEGFA emicrodensidade vascular (MDV).

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o perfil de expressão dos genes GPC1, 3 e 5, associando-os com genes da via HH (SHH, PTCH1 e SMO) e VEGFA, bem como caracterizar a imunexpressão destas proteínas, em CEB.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de expressão dos genes GPC1, GPC3 e GPC5 em CEB.
- Associar o perfil de expressão de genes GPC1, GPC3 e GPC5, com os níveis dos transcritos de genes da via HH (SHH, PTCH1 e SMO) e VEGFA.
- Caracterizar a imunexpressão das proteínas GPC1, GPC3 e GPC5 no CEB, Margem Adjacente ao Tumor (MAT) e Mucosa Bucal Não Neoplásica (MNN).
- Investigar a relação entre os níveis dos transcritos GPC1, GPC3 e GPC5 com aspectos clínicos, diferenciação tumoral, proliferação celular e microdensidade vascular (MDV).

5 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

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.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Foram obtidos 38 casos de CEB e Margens Adjacentes ao Tumor (MAT) de pacientes admitidos no Hospital Aristides Maltez (HAM) (Salvador, Bahia), no período compreendido entre 2011-2013. Todos os pacientes foram abordados na consulta inicial do HAM e convidados a participar da pesquisa, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelos Comitês de Ética do CPqGM e HAM.

Os fragmentos de CEB foram obtidos dos espécimes cirúrgicos durante a cirurgia para tratamento da doença e as amostras de MAT foram obtidas da margem lateral, após remoção da peça cirúrgica. Parte destes foi acondicionado em RNAlater, por no máximo 24h e, posteriormente estes fragmentos foram congelados por imersão em nitrogênio líquido, mantidos em freezer -80°C até os ensaios de expressão gênica. Outra porção do espécime cirúrgico foi fixado em formol tamponado neutro a 10% e encaminhado para processamento histológico. Para uma análise comparativa, 4 casos de mucosa bucal não neoplásica (MNN) de pacientes saudáveis foram obtidas a partir da remoção de terceiros molares não irrompidos.

Como critérios de inclusão para este trabalho foram considerados: RNA com qualidade e quantidade suficiente para as reações de qPCR, tecido preservado e passível de análise microscópica, diagnóstico de carcinoma escamocelular localizado na cavidade bucal

(dois terços anteriores da língua, assoalho bucal, palato duro, mucosa jugal, região retromolar e gengiva). Os critérios de exclusão foram: RNA de baixa qualidade, morfologia tecidual comprometida, blocos de parafina com pouco material e lesões localizadas em lábio.

Após a qualificação das amostras segundo os critérios de inclusão/exclusão, os estudos de expressão gênica foram realizados com um total de 31 CEBs e 12 MAT. Já a avaliação imuno-histoquímica foi realizada com 26 CEBs, 9 MAT e 4 MNN.

5.3 ESTUDO HISTOLÓGICO

Para a revisão e análise morfológica dos casos de CEB, cortes de 4µm de espessura foram obtidos dos espécimes fixados em formol e emblocados em parafina, sendo submetidos à coloração pela hematoxilina/eosina, conforme a rotina do Serviço de Histotecnologia do CPqGM. De forma similar, as MATs foram analisadas para verificar a existência de displasia epitelial oral (DEO) e ausência de tumor. Os parâmetros definidos pela Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005) (Tabela 1) foram utilizados para a gradação histológica.

Tabela 1. Critérios utilizados para gradação de DEOs e CEBs.

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

CEB bem diferenciado: quando as características arquiteturais e citológicas assemelham-se ao epitélio escamoso normal.

CEB moderadamente diferenciado: presença de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica, incluindo mitoses atípicas, menor queratinização.

CEB pouco diferenciado: presença elevada de mitoses atípicas e mínima queratinização.

DEO discreta: quando as alterações arquiteturais, acompanhadas de atipia citológica, envolvem o terço inferior do epitélio.

DEO moderada: quando as alterações arquiteturais, acompanhadas de atipia citológica, estendem-se ao terço médio do epitélio.

DEO intensa: quando as alterações arquiteturais, acompanhadas de atipia citológica, estendem-se ao terço superior do epitélio.

Fonte: OMS, 2005

5.4 ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA

5.4.1 Isolamento de Rna Total e Transcrição Reversa (RT-PCR)

Todos os experimentos foram realizados em condições DNase/RNase free. Para o procedimento de extração de RNA, foram utilizadas microcolunas de sílica- Rneasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan). O tecido das amostras foi pulverizado com “beads” (L-Beader, Loccus Biotecnologia), em tubos previamente resfriados a -20°C.

Em seguida, procedeu-se com o tratamento químico das amostras, utilizando 700uL de tampão contendo tiocianato de guanidina (*Buffer RLT*, RNEasy Mini Kit™, QIAGEN, Tokyo, Japan), homogeneização em vórtex e separação de fases, através de centrifugação por 5 min, a 13.200 xg. O sobrenadante foi então transferido para um novo microtubo e homogeneizado com 700uL de etanol 70%. Esta solução foi transferida para microcolunas de

sílica e, após sequências de centrifugações rápidas, foram efetuadas lavagens com tampões do kit (RW1 e RPE). O RNA foi eluído com 50µL de água Rnase/Dnase Free pH 7.4 (Rneasy Mini Kit, QIAGEN™, Tokyo, Japan) e armazenado em temperatura de -80°C

A pureza do RNA extraído de cada amostra foi analisada em aparelho de espectrofotometria (NanoDrop™, Thermo Scientific, Wilmington, USA) e a quantidade de RNA total foi avaliada por fluorimetria (QuBit™, Life Technologies, USA). O DNA genômico foi eliminado pelo uso da enzima DNase I (Invitrogen Corporation, USA). Para a transcrição reversa, foi utilizada a enzima transcriptase Superscript VILO™ (Invitrogen Corporation, USA) e as amostras de cDNA armazenadas em temperatura de -20°C.

5.4.2 Reações de PCR Em Tempo Real - QPCR

As reações de qPCR foram realizadas utilizando TaqMan Gene Expression Assays™ inventoriados para os genes *SHH* (Hs00179843_m1), *PTCH1* (Hs00181117_m1), *SMO* (Hs01090242_m1), *GPC1* (Hs00892476_m1), *GPC3* (Hs00170471_m1), *GPC5* (Hs00270114_m1) e *VEGFA* (Hs00900055_m1), assim como para os genes referências *ACTB* (Hs01060665_g1), *B2M* (Hs99999907_m1) e *UBC* (Hs01871556_s1). As reações foram conduzidas no aparelho ABI ViiA7 Fast (Applied Biosystems™, Foster City, CA), utilizando placa de 96 poços e com um volume total de 20 µL. Cada um dos poços possuía: 2.5ng/µL de cDNA da amostra (8µL), 1µL de Assay (Applied Biosystems™, Foster City, CA), 10µL de Taqman PCR Master Mix Kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA) e 5µL 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.

5.4.3 Análise da Expressão Gênica

Após as corridas de amplificação e dissociação, os valores de Quatificação Relativa (QR) foram obtidos com o auxílio do programa Gene Expression Suite™ (AppliedByosystems, USA), de acordo com o método comparativo de Cq ($\Delta\Delta CQ$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A fórmula matemática está descrita abaixo:

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

Após avaliação de 6 genes candidatos à referência (*HPRT1*, *18S*, *GAPDH*, *UBC*, *B2M* e *ACTB*), as amostras foram normalizadas através da média geométrica dos valores de Cq dos genes referências, *ACTB*, *B2M* e *UBC* (Figura 3) (HUGGETT et al., 2005; VANDESOMPELE et al., 2002). O calibrador das reações (B5) foi um *pool* de 12 amostras de MAT.

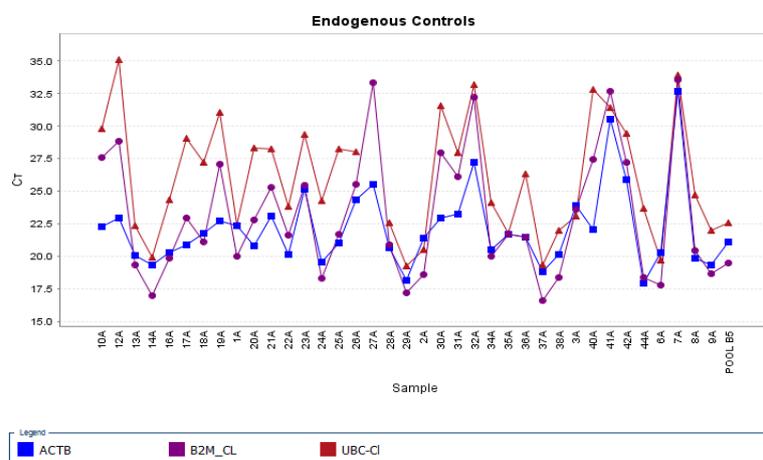


Figura 3. Demonstração dos genes referências ACTB, B2M e UBC na amostra de CEB.

5.5 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

Cortes de 4µm de espessura foram obtidos dos espécimes fixados em formol e emblocados em parafina, sendo dispostos em lâminas de vidro previamente limpas e silanizadas. Inicialmente foram efetuadas reações de padronização para determinar as melhores diluições, métodos de recuperação antigênica e tempo de incubação de cada anticorpo, conforme rotina do nosso grupo de pesquisas. A seguir, os casos foram submetidos à imunomarcção para os anticorpos GPC1, GPC3, GPC5, MCM3 e CD105. Dados sobre fabricante, clone, diluição, recuperação e controle positivo dos anticorpos estão descritos na Tabela 2.

As secções histológicas seguiram para desparafinização em xilol e re-hidratação com álcool. Para exposição dos epítomos antigênicos, as secções foram submetidas à recuperação antigênica, em calor úmido por 45 minutos, conforme descrito na Tabela 2. O bloqueio da peroxidase endógena (Peroxidase Blocking Solution™, Dako, Carpinteria, USA) foi realizado protegido da luz, por 10 minutos, e o bloqueio das proteínas teciduais realizado também por 10 minutos (Protein Blocking Solution™, Dako, Carpinteria, USA). Os anticorpos primários foram incubados overnight (18h), à temperatura de 4°C.

Em seguida a incubação do anticorpo primário, os reagentes HRP Link e HRP Enzyme (Advance™, Dako Corporation, Carpinteria, USA) foram aplicados nos cortes histológicos, 20 minutos cada. Para o anticorpo anti-GPC1, o sistema de detecção foi o LSAB K0610 (Dako Corporation, Carpinteria, USA). As reações foram reveladas com 3,3-diaminobenzidina (Dako Corporation, Carpinteria, USA), por 5 minutos, em câmara escura e, posteriormente, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto e montadas com permount. Para o controle negativo, cada anticorpo primário foi substituído por soro normal de mesmo isotipo.

Tabela 2. Dados dos clones dos anticorpos, recuperação antigênica e diluição.

Anticorpo	Marca comercial	Clone	Controle positivo	Recuperação antigênica	Diluição
GPC1	Santa Cruz	Policlonal	Placenta	Citrato pH 6.0	1:300
GPC3	Santa Cruz	1312	Placenta	Citrato pH 6.0	1:100
GPC5	Novus Biologicals	EPR6756(B)	Carcinoma pulmonar	Citrato pH 6.0	1:300
MCM3	Dako	101	Câncer de mama	Citrato pH 9.0	1:50
CD105	Dako	SN6h	Placenta	Citrato pH 9.0	1:50
SHH	Novus Biologicals	SH4	Placenta	Citrato pH 6.0	1:1000
GLI1	Novus Biologicals	Policlonal	Placenta	Citrato pH 6.0	1:600

5.6 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

As lâminas foram escaneadas em microscópio digital virtual VS110 (*Olympus Corporation*, Tóquio, Japão) e exibidas em um monitor de alta definição com auxílio do Olyvia™ 2.3 Software (*Olympus Corporation*, Tóquio, Japão) e analisadas das seguintes formas:

a) Proteínas GPC1, GPC3 e GPC 5 :

Para análise destas proteínas, todos os cortes histológicos (CEB, MAT e MNN) foram analisados em sua totalidade, com auxílio das ferramentas de varredura e aumentos progressivos do programa Olyvia™ 2.3 Software (*Olympus Corporation*, Tóquio, Japão). Levou-se em consideração a localização do antígeno: membranal e/ou citoplasmático, em parênquima/epitélio ou estroma/lâmina própria. Em seguida, as amostras foram categorizadas utilizando os seguintes critérios de semi-quantificação: (-) Negativo, escore (0) até 5% de células imunomarcadas; (1+), entre 6-25% de células imunomarcadas; (2+), entre 26-50% de células imunomarcadas; (3+), entre 51-75% de células imunomarcadas e (4+), mais de 75% das células positivas (GURGEL et al., 2008).

b) Avaliação do Potencial Proliferativo:

Foram analisados 5 campos representativos em cada caso de CEB, em aumento final de 200x. As células que exibiram marcação nuclear positiva para a proteína MCM3 foram contadas em cada campo, com auxílio do programa Image JTM (National Institutes of Health - NIH, 1997), e o número absoluto de células MCM3 positivas calculado para cada caso. Após a análise de todos os casos, foi calculada a mediana de imunomarcação e o intervalo de confiança (IC), sendo os tumores divididos em dois grupos: àqueles que exibiam número de células MCM3 positivas maior que a mediana (AP, Alto potencial proliferativo) e menor que a mediana (BP, Baixo potencial proliferativo). Os casos que possuíam o número de células MCM3 positivas dentro do IC foram excluídos das comparações.

c) Microdensidade Vascular (MDV):

Foram selecionadas 5 áreas *hot spots* de vasos CD105+, em aumento final de 200x. Apenas vasos sanguíneos que mostravam luz e coloração acastanhada foram contados em cada área, as quais foram medidas e o resultado final foi dado em número de vasos/mm² (MDV). Em seguida, foi calculada a mediana de MDV e o intervalo de confiança (IC), sendo os tumores divididos em dois grupos: àqueles que exibiam MDV/mm² maior que a mediana (Alta MDV) e menor que a mediana (Baixa MDV). Não foram avaliados os casos que possuíam a MDV/mm² dentro do IC.

5.7 DUPLA-MARCAÇÃO

A co-localização das proteínas GPC3/SHH e GPC5/SHH em CEBs foi identificada utilizando o kit EnVisionTM G2 Doublestain System e o sistema polimérico de amplificação

AdvanceTM (Dako Corporation, Carpinteria, USA), com os cromógenos Red Permanent e Vina Green. Para as proteínas GPC5/GLI1, foi utilizado o sistema EnVisionTM G2 Doublestain System e o o sistema polimérico de amplificação AdvanceTM (Dako Corporation, Carpinteria, USA), com os Red Permanent e cromógenos 3,3-diaminobenzidina. As diluições, marcas comerciais e controles positivos das reações estão descritos na tabela 2.

a) SHH/GPC3 e SHH/GPC5

Os cortes histológicos seguiram para desparafinização em xilol e re-hidratação com álcool. As secções foram submetidas à recuperação antigênica com citrato pH 6.0, em calor úmido por 45 minutos, para exposição dos epítomos antigênicos. O bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas teciduais, foi realizado utilizando o reagente Dual Endogenous Enzyme BlockTM (Dako Corporation, Carpinteria, USA), em temperatura ambiente (TA) por 10 minutos.

O primeiro anticorpo primário, GPC3 ou GPC5, foi incubado *overnight* a 4°C. Em seguida, os cortes foram expostos inicialmente ao reagente Rabbit/Mouse LinkTM (Dako Corporation, Carpinteria, USA) por 20 minutos; depois foi aplicado o Polymer/AP por 20 minutos. O cromógeno Permanent Red Working Solution (Dako Corporation, Carpinteria, USA), por 15 minutos, foi utilizado para revelar a reação.

O passo seguinte foi expor os cortes histológicos revelados para o primeiro anticorpo primário com a solução Doublestain Block HRPTM (Dako Corporation, Carpinteria, USA), por 10 minutos. A incubação do segundo anticorpo primário (SHH) foi realizada por 1 hora em TA. O sistema de detecção AdvanceTM, (Dako Corporation, Carpinteria, USA), composto pelos reagentes HRP Link e HRP Enzyme, foram aplicados nos cortes histológicos, 20

minutos cada. Para revelar esta segunda reação foi utilizado a solução Vina Green (Biocare Medical), por 20 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada e montadas em glicerina 10%.

b) GP5/ GLI1

Os cortes histológicos seguiram para desparafinização em xilol e re-hidratação com álcool. As secções foram submetidas à recuperação antigênica com citrato pH 6.0, em calor úmido por 45 minutos, para exposição dos epítomos antigênicos. O bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas teciduais, foi realizado utilizando o reagente Dual Endogenous Enzyme Block™ (Dako Corporation, Carpinteria, USA), em temperatura ambiente (TA) por 10 minutos.

O primeiro anticorpo primário (GPC5) foi incubado *overnight* a 4°C. Em seguida, os cortes foram expostos inicialmente ao reagente Rabbit/Mouse Link™ (Dako Corporation, Carpinteria, USA) por 20 minutos; depois foi aplicado o Polymer/AP por 20 minutos. O cromógeno Permanent Red Working Solution (Dako Corporation, Carpinteria, USA), por 15 minutos, foi utilizado para revelar a reação.

O passo seguinte foi expor os cortes histológicos revelados para o primeiro anticorpo primário com a solução Doublestain Block HRP™ (Dako, Carpinteria, USA), por 10 minutos. A incubação do segundo anticorpo primário (GLI1) foi realizada por 1 hora em TA. O sistema de detecção Advance™, (Dako Corporation, Carpinteria, USA), composto pelos reagentes HRP Link e HRP Enzyme, foram aplicados nos cortes histológicos, 20 minutos cada. Para revelar esta segunda reação foi utilizado 3,3-diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, USA), por 5 minutos, em câmara escura e montadas com permount.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após análise, os resultados obtidos foram compilados em um banco de dados organizado em planilhas do *Software GraphPad Prism*. Os dados foram analisados segundo a distribuição na curva normal de Gauss e, a partir da análise estatística descritiva destes (Média, Mediana, Desvio Padrão, Curtose e Variância) foram aplicados testes paramétricos e não-paramétricos, a depender da distribuição simétrica ou assimétrica dos resultados.

Os seguintes testes estatísticos foram aplicados:

- Teste de Fisher: para testar diferenças entre os diferentes parâmetros clínicos e morfológicos;
- Teste de Mann Whitney e Teste T não-pareado: para comparar dois grupos independentes;
- Teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn : para comparar 3 ou mais grupos; Teste de correlação de Spearman: para avaliar a correlação entre duas variáveis.

Para todos os testes foi considerado o nível de significância 5%.

6 RESULTADOS

6.1 ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS DO CEB

A amostra deste estudo foi composta por 31 CEBs, sendo que 23 lesões (74,19%) acometiam homens e 8 (25,81%) em mulheres. A idade dos pacientes variou de 41 a 85 anos, apresentando uma média de 57 (DP±11.43). O sítio anatômico predominante foi a língua (n=13; 41,93%), seguido pelo assoalho de boca (n=10; 32,25%), região retromolar (n=5; 16,12%), gengiva (n=2; 6,25%) e palato (1; 3,25%). Vinte e oito pacientes (90,31%) relataram ser tabagistas, 25 (80,64%) etilistas e 25 (80,64%) tabagistas e etilistas.

Os tumores foram classificados de acordo com *TNM Classification of Malignant Tumours* (2002) e 15 CEBs (48,38%) foram considerados como T1-T2, 15 (48,38%) foram classificados como T3-T4, um caso (3,44%) não tinha a informação disponível. Considerando-se a presença ou ausência e a extensão de metástase em linfonodos regionais, 21 (67,55%) tumores foram classificadas como N1-N3 e apenas 9 casos (29,03%) não apresentaram comprometimento de linfonodo regional (N0), em um caso (3,22%) a informação estava indisponível. Todos os tumores foram M0 (100%).

De acordo com a classificação da OMS (2005), 18 CEBs (58,06%) foram classificados histologicamente como bem diferenciados, 7 (22,58%) como moderadamente diferenciados e 6 (19,36%) como pouco diferenciado. Do total de margens tumorais coletadas (n=38), apenas 9 (23,68%) estavam completamente livres de tumor e apenas estas foram incluídas no estudo imuno-histoquímico. Destas, 5 (55,55%) apresentavam displasia epitelial (DEO): 3 (60%)- DEO discreta, 1 (20%)- DEO moderada e 1- (20%) DEO intensa. As características clínicas e histológicas dos CEB estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Características clínicas e histológicas dos CEBs.

Parâmetros clínicos	Total (n)	%
Sexo		
Homem	23	74,18
Mulher	8	25,81
Tamanho		
T1-T2	15	48,38
T3-T4	15	48,38
Não Classificado	1	3,44
Metástase – Linfonodo		
N0	9	29,03
N1-N3	21	67,55
Não Classificado	1	3,22
Metástase – Distância		
M0	31	100,00
Gradação Histológica		
Bem diferenciado	18	58,06
Moderadamente diferenciado	7	22,58
Pouco diferenciado	6	19,36
Sítio anatômico		
Língua	13	41,93
Assoalho bucal	10	32,25
Região retromolar	5	16,12

6.2 EXPRESSÃO DE GENES *SHH* E *GPCS*

Transcrito do gene *SHH* foi observado em 5 CEBs (16,13%). Os valores de quantificação relativa variaram de 4,108 a 137,9, com nível médio de QR 63,98 acima da amostra calibradora. (Figura 6). Os níveis de expressão de *SHH* RNAm não estavam associados a características clínicas e histológicas, nesta casuística (Tabela 4).

Tabela 4. Associação entre a expressão do gene *SHH*, parâmetros clínicos e histológicos.

Parâmetros	<i>SHH</i>		
	Total	CEBs positivos (%)	<i>P</i>
Tamanho			
T1-T2	14	3 (9,67)	0,63
T3-T4	16	2 (6,45)	
Invasão de linfonodo			
N0	9	3 (9,67)	1,00
N1-N3	21	2 (6,45)	
Tabagismo			
Sim	28	5 (16,12)	1,00
Não	3	0 (0)	
Etilismo			
Sim	25	5 (16,12)	0,55
Não	6	0 (0)	
Gradação Histológica			
Bem diferenciado	17	3 (9,67)	0,63
Moderadamente/pouco diferenciado	14	2 (6,45)	

Nota: Teste de Fisher, $p < 0,05$

Em 25 (80,6%) CEBs foi observado expressão do gene *PTCHI*. Os valores de QR variaram entre 0,304 a 42,33 (Figura 6) e o nível médio deste transcrito foi 8,036 superior em comparação a amostra referência. Os níveis de *PTCHI* RNAm foram similares nos diferentes parâmetros clínicos e morfológicos avaliados (Tabela 5).

Expressão do gene de *SMO* foi observada em 26 (83,87%) CEBs, com QR variando entre 0,135 a 16,74 e uma média de expressão igual a 2,821 (Figura 6). Maiores níveis de *SMO* RNAm foram encontrados em CEBs com comprometimento de linfonodo (N1-N3) ($p=0,02$; Figura 4). Considerando-se os demais parâmetros clínicos e morfológicos avaliados, os níveis deste transcrito foram similares (Tabela 5).

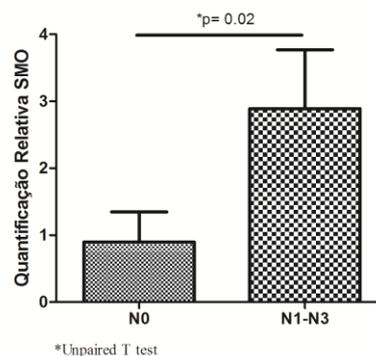


Figura 4. Expressão gênica de *SMO* em CEBs com invasão e sem invasão de linfonodos.

Quanto a presença de *GPC1* RNAm, 26 (83,87%) CEBs foram positivos. Os valores de QR variaram entre 0,305 a 9,148 e uma média de expressão igual a 2,51 acima dos níveis do calibrador (Figura 6). Transcrito de *GPC3* foi encontrado em 22 (70,97%) tumores, com QR variando entre 0,007 a 0,958 (Figura 6), estando este gene subregulado e um nível médio de QR=0,167 abaixo da expressão da amostra referência. Já o *GPC5* estava expresso em 15 (48,38%) CEBs e os valores de QR variaram entre 0,08 a 93,92 e uma média de QR=7,721, estando este gene superexpresso quando comparado ao calibrador (Figura 6). A maioria dos casos de CEB (n=28; 90,32%) apresentaram transcritos de *VEGFA*, com QR variando entre 0,55 a 24,29. A média de QR foi 5,08 superior à amostra calibradora (Figura 6). Maiores níveis deste transcrito foram observados em tumores caracterizados como T3-T4 (p=0,03; Figura 5).

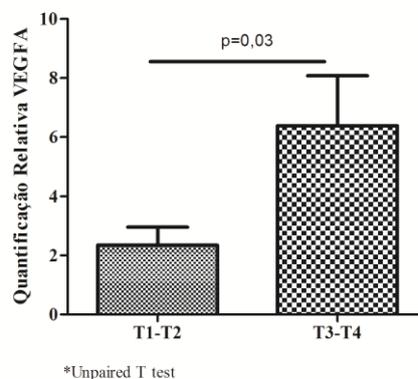


Figura 5. Expressão gênica de *VEGFA* em CEBs T1-T2 e T3-T4.

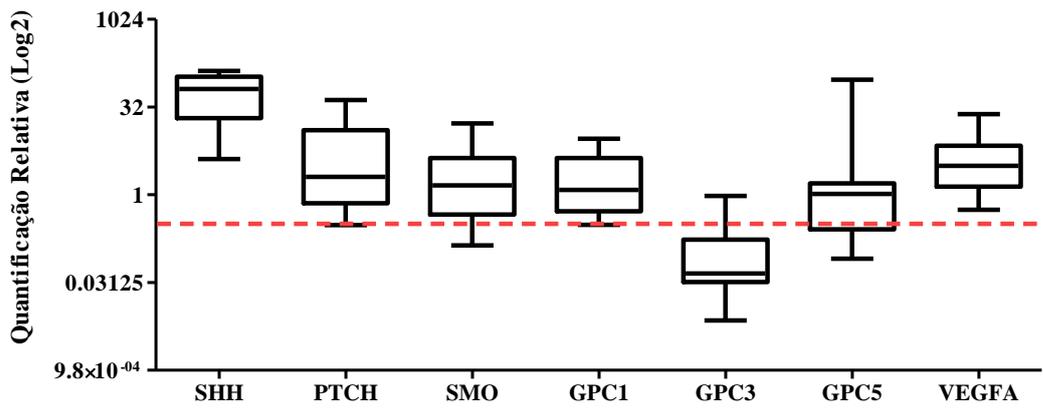


Figura 6. Perfil de expressão dos genes *SHH*, *PTCH1*, *SMO*, *GPC1*, *GPC3*, *GPC5* e *VEGFA*, em comparação à amostra calibradora.

Considerando os diferentes parâmetros clínicos e morfológicos, nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada para os genes *GPC1*, *GPC3*, *GPC5* e *VEGFA* (Tabela 5).

Tabela 5. Associação dos genes *PTCH1*, *SMO*, *GPC1*, *GPC3*, *GPC5* e *VEGFA* segundo parâmetros clínicos e morfológicos.

Parâmetros	<i>PTCH1</i>			<i>SMO</i>			<i>GPC1</i>			<i>GPC3</i>			<i>GPC5</i>			<i>VEGFA</i>		
	Total	Mediana	P	total	Média	P	Total	Média	P	Total	Média	p	total	Mediana	p	total	Média	p
Tamanho																		
T1-T2	15	0,79	0,50*	15	2,39	0,50	15	2,61	0,21	15	0,13	0,38	15	0,08	0,94*	15	2,54	0,03
T3-T4	13	0,67		14	2,11		15	1,45		15	0,11		14	0		15	6,45	
Invasão de linfonodo																		
N0	9	0,64	0,07*	9	0,89	0,02	9	2,07	0,59	9	0,12	0,68	10	0,25	0,23*	9	4,16	0,32
N1-N3	20	1,62		21	2,93		21	1,98		21	0,11		20	0		21	4,74	
Tabagismo**																		
Sim	27	0,79	0,15*	28	0	0,77*	28	0	0,41*	28	0,12	0,45*	27	0,08	-	28	2,82	0,87
Não	3	0,48		3	0		3	1,59		3	0,01		3	0		3	4,60	
Etilismo																		
Sim	24	0,88	0,06*	26	0,36	0,84	25	2,42	0,63	25	0,13	0,56	24	0,04	0,97*	25	4,78	0,90
Não	6	0,73		5	0,20		6	1,42		6	0,03		6	0		6	2,41	
Gradação Histológica																		
Bem diferenciado	18	0,86		18	1,74		18	1,81		18	0,13		17	1,21		18	5,0	
Moderadamente diferenciado	7	0,68	0,21*	7	3,52	0,47	7	2,03	0,24	7	0,06	0,53	7	0,15	0,17*	7	3,60	0,80
Pouco diferenciado	5	2,52		6	2,39		6	4,03		6	0,14		6	0,45		6	4,94	
Localização																		
Assoalho Bucal	9	0,88		10	3,66		10	2,78		9	0,17		10	0,04		10	4,23	
Língua	12	1,29	0,94*	13	2,18	0,76	13	1,58	0,40	14	0,12	0,32	12	0	0,43*	13	4,93	0,58
Região Retromolar	5	0,68		5	1,18		5	4,18		5	0,05		5	0,08		5	6,88	

Nota: *Mann Whitney ou Kruskal-Wallis/ **Para o parâmetro Tabagismo, os valores de QR correspondem a mediana.

6.3 CORRELAÇÃO ENTRE GENES HH, VEGFA E GPC5

Correlação positiva forte e estatisticamente significativa foi demonstrada para *GPC5* e *PTCH1* ($r_s= 0,60$; $p=0,02$; Figura 7) e entre *PTCH1* e *VEGFA* ($r_s= 0,69$; $p=0,0003$; Figura 8). Todas as demais correlações entre os genes estudados podem ser verificadas na Tabela 6.

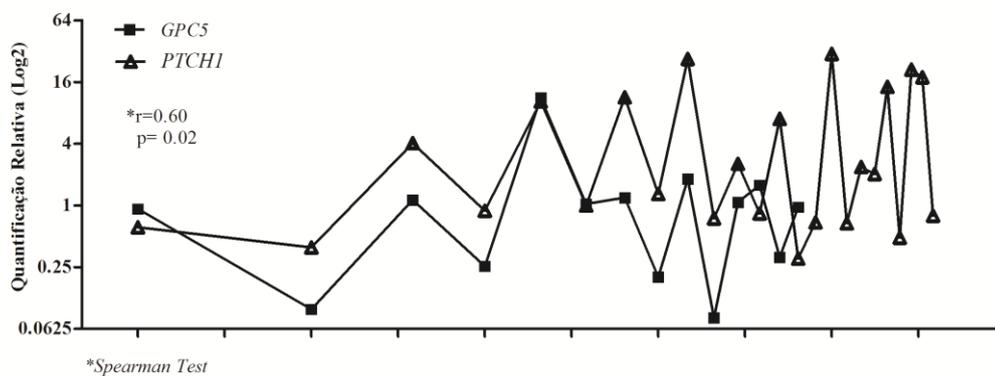


Figura 7. Correlação entre *PTCH1* e *GPC5*.

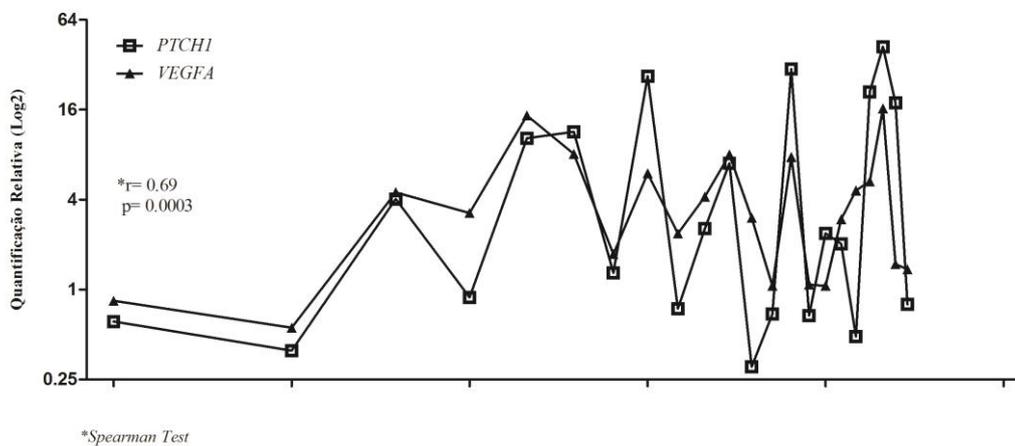


Figura 8. Correlação entre *PTCH1* e *VEGFA*.

Tabela 6. Correlações entre os genes *SHH*, *PTCH1*, *GPC1*, *GPC3*, *GPC5* e *VEGFA*.

Correlações	Coefficiente de Spearman (rs)	P
<i>SHH e PTCH1</i>	0,20	0,91
<i>SHH e GPC3</i>	-0,80	0,33
<i>SHH e GPC1</i>	-0,80	0,33
<i>SHH e GPC5</i>	0,40	0,75
<i>PTCH1 e GPC1</i>	-0,27	0,18
<i>PTCH1 e GPC3</i>	-0,20	0,37
<i>PTCH1 e GPC5</i>	0,60	0,02
<i>PTCH1 e VEGFA</i>	0,69	0,0003
<i>SMO e GPC1</i>	0,20	0,31
<i>SMO e GPC3</i>	-0,07	0,75
<i>SMO e GPC5</i>	-0,36	0,89
<i>VEGFA e GPC1</i>	0,17	0,38
<i>VEGFA e GPC5</i>	0,35	0,20

6.4 IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS GPC1, GPC3 E GPC5 EM MNN, MAT E CEB

a) GPC1

Em mucosa não-neoplásica (MNN), a proteína GPC1 foi observada exclusivamente em membrana e citoplasma de células epiteliais, especialmente do estrato espinhoso, com escores 3+ (n=3; 75%) e 2+ (n=1; 25%). As mucosas adjacentes ao tumor (MAT) exibiram o mesmo padrão de marcação, com escores 3+ (n= 4; 44,44%) e 4+ (n= 5; 55,56%). No grupo dos CEBs, 12 (46,15%) tumores apresentaram células do parênquima positivas, sendo que 8 (66,66%) destes exibiram menos de 5% de células imunomarcadas (escore 0). Os escores 2+ e 3+ foram observados em 3 (11,53%) e 1 (3,84%) CEBs, respectivamente. Notou-se uma perda da imunomarcação de GPC1 em regiões de “Front” de invasão tumoral e células positivas eram observadas especialmente no centro das ilhas. Poucos vasos sanguíneos positivos foram

visualizados apenas em CEBs. A imunomarcação de GPC1 em CEBs não estava associada aos parâmetros clínicos e histológicos avaliados (Tabela 7). A Figura 9 ilustra o padrão e características peculiares de marcação de GPC1 nos grupos estudados.

b) GPC3

Imunoexpressão da proteína GPC3 não foi detectada em MNN (n= 4; 0%), e MAT (n=9; 0%). Já no grupo dos CEBs, as imunomarcações membranar, predominante, e citoplasmática foram detectadas em células do parênquima, em 23 (88,46%) casos. Destes, 11 (42,30%) tumores apresentaram menos de 5% de células imunomarcadas (escore 0), seguido dos escores 1+ (n=5;19,23%), 3+ (n=3; 11,56%), 2+ (n=2; 7,69%) e escore 4+ (n=2; 7,69%). As células tumorais imunopositivas foram observadas principalmente na periferia das ilhas tumorais e uma maior expressão desta proteína foi detectada no “Front” de invasão tumoral, sendo esta predominantemente citoplasmática. A distribuição dos escores encontrados para GPC3 em CEB está detalhada na Tabela 8. A imunomarcação de GPC3 em CEBs não estava associada aos parâmetros clínicos e histológicos avaliados (Tabela 7). A Figura 10 ilustra o padrão e características peculiares da distribuição de GPC3 nos grupos estudados.

c) GPC5

GPC5 não foi detectada em MNN (n= 4; 100%) e, em MAT células dos estratos basais e espinhoso exibiram marcação citoplasmática discreta, predominando o escore 1+ (n=2; 22,22%), enquanto 13 (50%) CEBs exibiram células tumorais positivas para esta proteína. Cinco (38,46%) CEBs tinham menos de 5% de células tumorais positivas (escore 0), enquanto os escores 1+, 2+ e 4+ foram identificados em 5 (38,46%), 2 (15,28%) e 1 (7,7%) CEBs, respectivamente. A marcação em estroma foi observada em

13 (50%) CEBs, especialmente em células endoteliais e fibroblastos. A tabela 8 ilustra a distribuição de escores de GPC5 em parênquima e estroma. A imunomarcagem de GPC5 em CEBs não estava associada aos parâmetros clínicos e histológicos avaliados (Tabela 7). A Figura 11 ilustra o padrão e características peculiares da distribuição de GPC5, nesta casuística.

Tabela 7. Avaliação das proteínas GPC1, GPC3 e GPC5 no parênquima e GPC5 no estroma de CEB, segundo parâmetros clínicos e histológicos.

Parâmetros	GPC1			GPC3			GPC5				
	Total	Parênquima CEBs positivos (%)	P	Total	Parênquima CEBs positivos (%)	p	Total	Parênquima CEBs positivos (%)	P	Estroma CEBs positivos (%)	p
Tamanho											
T1-T2	14	4 (15,38)	1,00	14	11 (42,30)	0,59	14	6 (23,07)	1,00	7 (26,92)	1,00
T3-T4	12	4 (15,38)		12	11 (42,30)		12	6 (23,07)		6 (23,07)	
Invasão de linfonodo											
N0	6	0 (0)	0,06	6	5 (19,23)	1,00	6	2 (7,69)	0,64	2 (7,69)	0,64
N1-N3	26	9 (34)		20	18 (69,23)		20	11 (42,30)		11 (42,30)	
Gradação Histológica											
Bem diferenciado	16	8 (30,76)	0,22	16	15 (57,69)	0,24	16	8 (30,76)	0,22	8 (30,76)	1,00
Moderadamente diferenciado	9	7 (26,92)		9	6 (23,07)		9	7 (28)		4 (15,38)	
Localização											
Língua	13	5 (19,23)	0,19	12	11 (42,30)	1,00	13	8 (30,76)	1,00	8 (30,76)	1,00
Assoalho	8	6 (23,07)		8	7 (26,92)		9	5 (19,23)		5 (19,23)	

Nota: Teste de Fisher,

Tabela 8. Distribuição dos escores das proteínas GPC3 e GPC5 no parênquima e estroma de CEB.

Escores	GPC3		GPC5	
	Parênquima	Estroma	Parênquima	Estroma
Negativo	Total (%)	Total (%)	Total (%)	Total (%)
0 (>5%)	3 (11,53)	25 (96,15)	13 (50)	13 (50)
1+	11 (42,30)	0 (0)	5 (19,23)	3 (11,56)
2+	5 (19,23)	0 (0)	5 (19,23)	6 (23,03)
3+	2 (7,69)	1 (3,85)	2 (7,69)	0 (0)
4+	3 (11,56)	0 (0)	0 (0)	3 (11,56)
	2 (7,69)	0 (0)	1 (3,85)	1 (3,85)

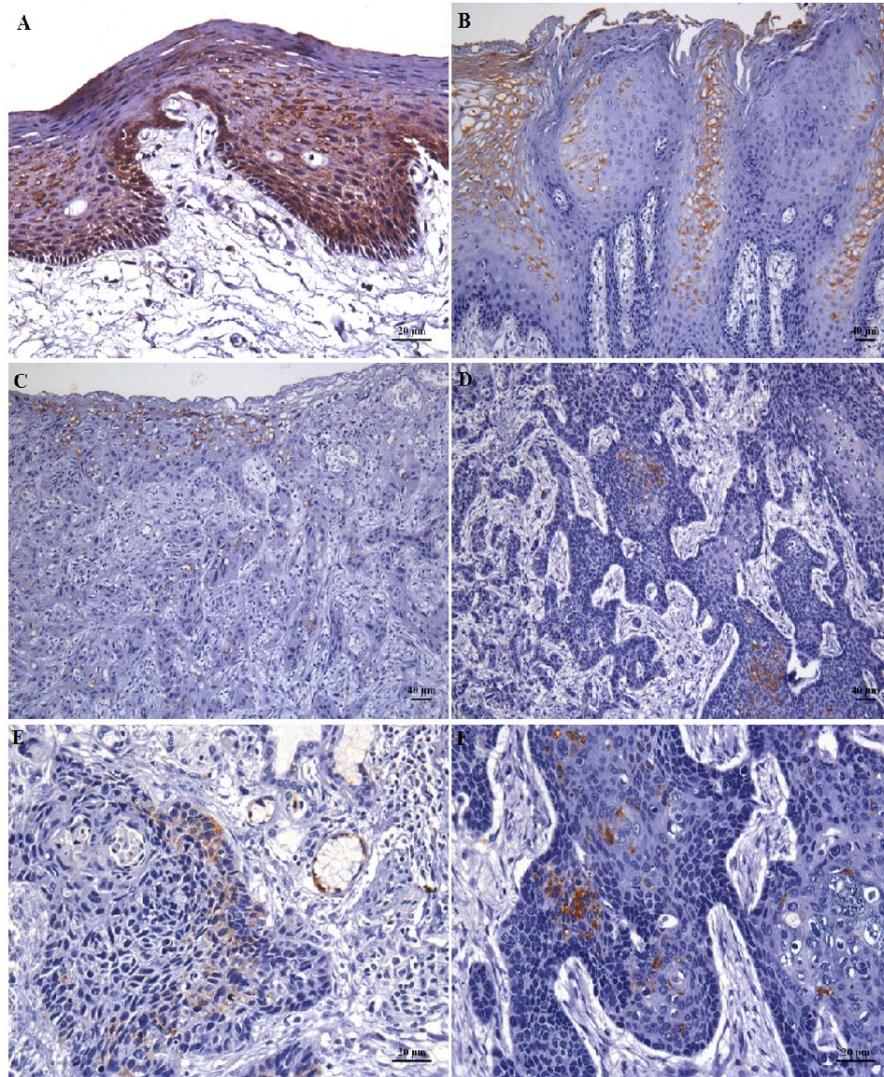


Figura 9. Padrão e distribuição da proteína GPC1 em Mucosa Não-neoplásica (MNN), Mucosa Adjacente ao Tumor (MAT) e Carcinoma Escamocelular Bucal (CEB). (A) MNN e (B) MAT, ambas secções exibindo imunomarcção predominante em membrana e em células dos estratos intermediários. (C) Perda de imunomarcção de GPC1 em “front” de invasão tumoral. (D) (E) e (F) CEBs ilhas tumorais com acúmulo focal de células GPC1 positivas. Em (E) observa-se vaso positivo para GPC1.

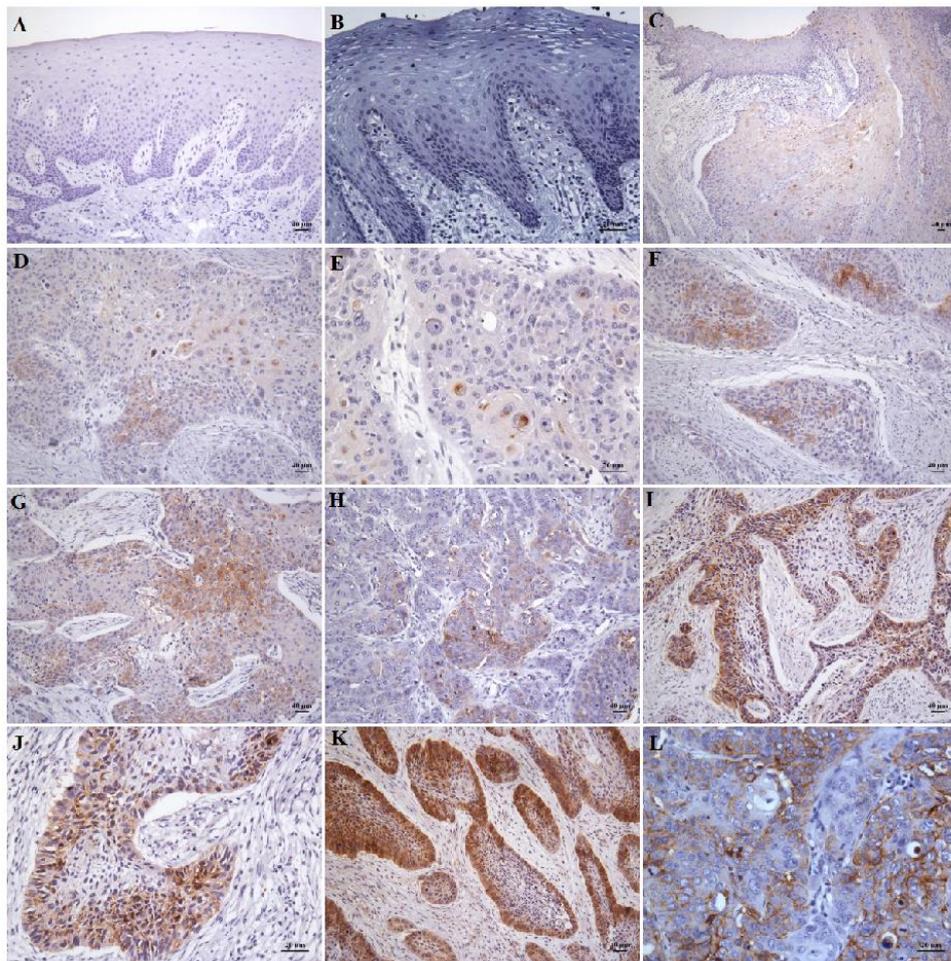


Figura 10. Padrão e distribuição da proteína GPC3 em Mucosa Não-neoplásica (MNN), Mucosa Adjacente ao Tumor (MAT) e Carcinoma Escamocelular Bucal (CEB). (A) MNN e (B) MAT, ambas negativas para GPC3. (C) “Front” de invasão tumoral onde se observa algumas células com imunomarcção de GPC3. (D) e (E) Células tumorais na região do “Front” de invasão tumoral exibindo predominante marcação citoplasmática granular. (F) (G) e (H) CEBs exibindo pouca imunomarcção para GPC3, especialmente em citoplasma. (I) e (J) Imunomarcção escore 2+, especialmente em células da periferia das ilhas tumorais. (K) Imunomarcção de escore 4+. (L) Detalhe da imunomarcção membranar.

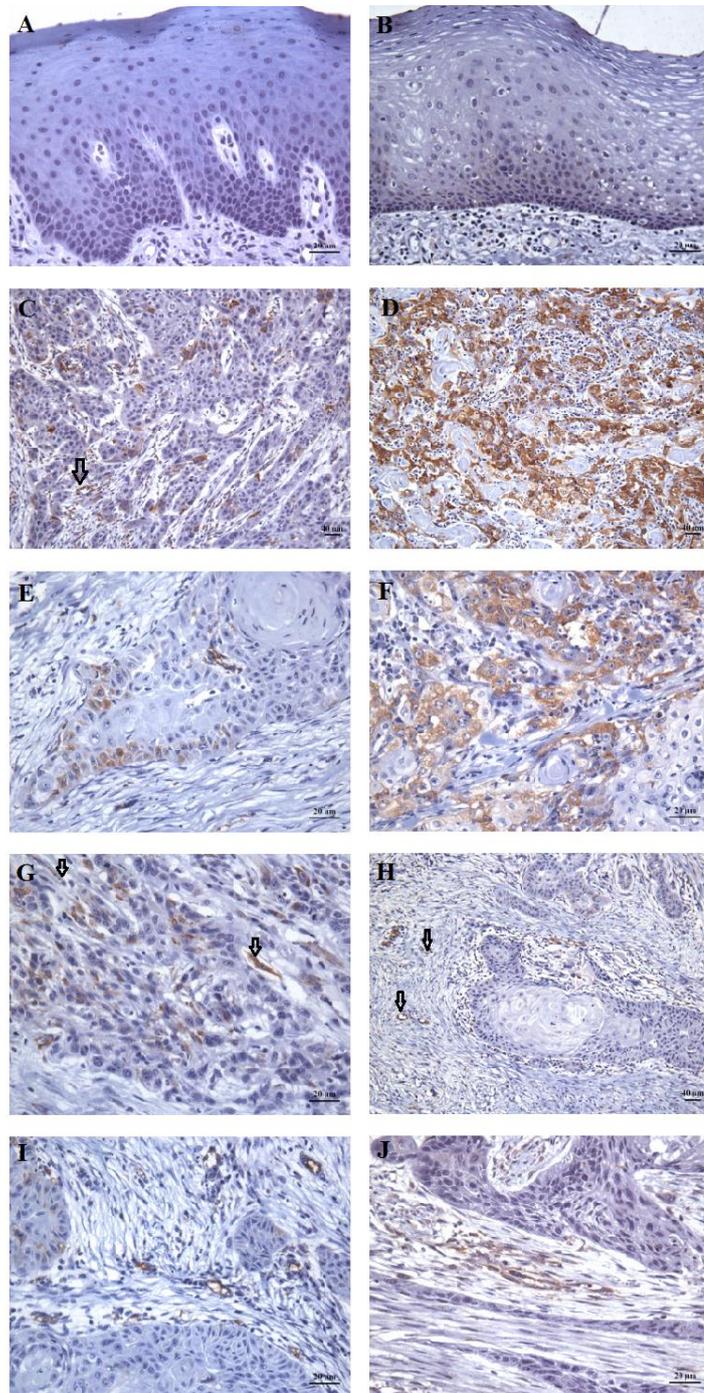


Figura 11. Padrão e distribuição da proteína GPC5 em Mucosa Não-neoplásica (MNN), Mucosa Adjacente ao Tumor (MAT) e Carcinoma Escamocelular Bucal (CEB). (A) MNN negativa para GPC5. (B) MAT exibindo marcação citoplasmática fraca em células basais e do estrato espinhoso. (C) Células tumorais positivas em citoplasma e marcação em células endoteliais (seta). (D) Imunomarcação de escore 4+ em células tumorais. (E) e (F) Detalhe da imunomarcação citoplasmática e (G) em fibroblastos (setas). (H) e (I) Imunomarcação positiva em vasos do estroma tumoral (setas). (J) Células estromais positivas.

6.5 DUPLA-MARCAÇÃO EM CEB

a) SHH/GPC3

Em CEB, a imunomarcação da proteína SHH foi observada no citoplasma de células parênquima e estroma. A imunomarcação citoplasmática de GPC3 foi notada em parênquima de CEB. A co-localização das proteínas SHH e GPC3 foi observada no citoplasma com aspecto roxa em ilhas do parênquima tumoral (Figura 12).

b) SHH/ GPC5

Imunomarcação da proteína SHH foi observada no citoplasma de células parênquima e estroma de CEB. A imunomarcação citoplasmática de GPC5 foi notada em parênquima, assim como no estroma tumoral, predominantemente em células endoteliais. A co-localização das proteínas SHH e GPC5 foi observada no citoplasma com aspecto roxa em ilhas do parênquima e estroma tumoral (Figura 12).

c) GLI1/GPC5

A imunoexpressão da proteína GLI1 ocorreu no citoplasma e, predominantemente, no núcleo de células parênquima e estroma de CEB. A imunomarcação citoplasmática de GPC5 foi notada em parênquima e estroma, neste último compartimento ocorrendo especialmente em células endoteliais. Células que apresentavam imunomarcação nuclear para a proteína GLI1 apresentaram células com citoplasma positivo para GPC5, tanto no parênquima quanto no estroma de CEB. A Figura 12 demonstra a co-localização das proteínas GLI1 e GPC5 em CEB.

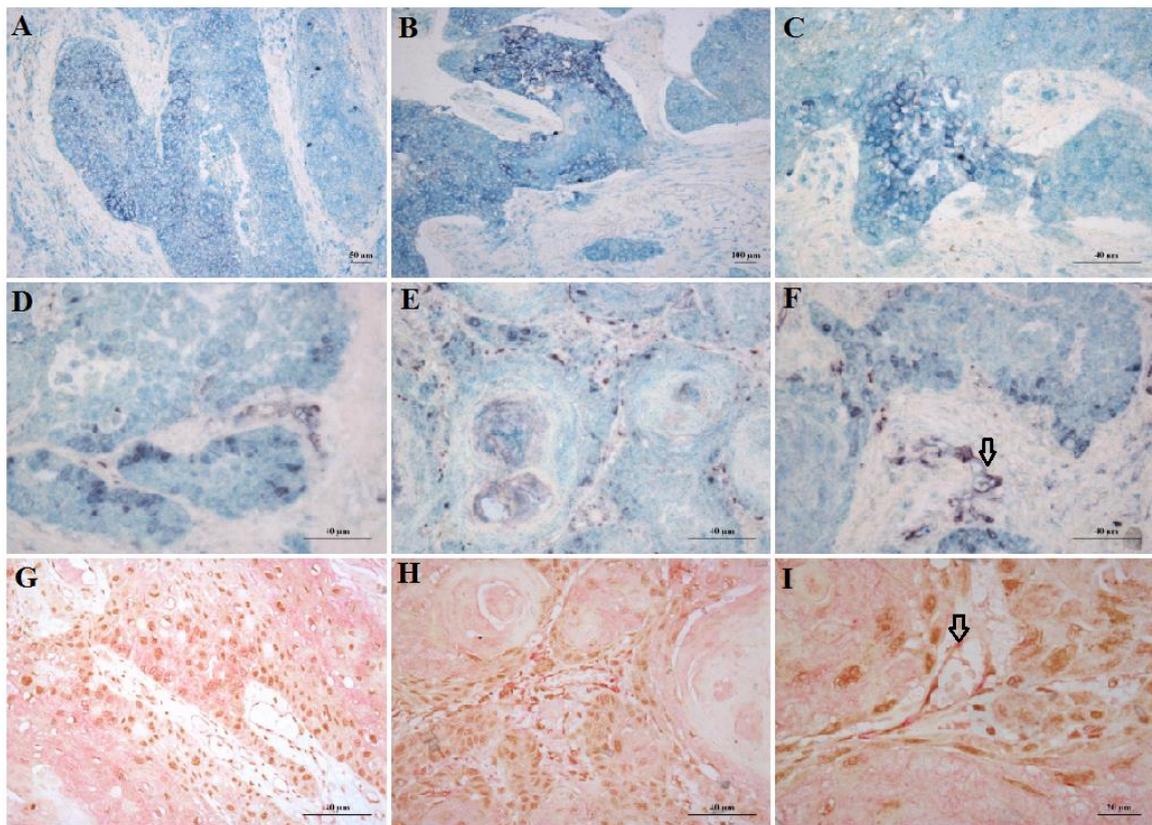


Figura 12. Dupla-marcação para as proteínas SHH/GPC3, SHH/GPC5 e GLI1/GPC5 em CEB. (A), (B) e (C) Co-localização das proteínas SHH e GPC3 em células tumorais. (D), (E) e (F) Proteínas SHH e GPC5 em citoplasma e membrana de células tumorais e estromais, especialmente em vasos sanguíneos (E, seta). (G), (H) e (I) Células tumorais e estromais exibindo GLI1 nuclear e GPC5 em citoplasma, incluindo em vasos sanguíneos (seta).

6.6 GENES *GPC1*, *GPC5* E *VEGFA* E MDV

Imunomarcagem para a proteína CD105 ocorreu em 25 (96.15%) casos de CEB, sendo observada exclusivamente em células endoteliais do estroma tumoral. Quando avaliado o número de vasos positivos para CD105 por área, a MDV variou entre 0 a 159.08 vasos/mm², com mediana igual a 77.71 vasos/mm². Nove amostras (34.61%) de CEB estavam no intervalo de confiança (60.70 a 98.54 vasos/mm²) e foram excluídas das comparações estatísticas. Os CEBs (n=17; 65.38%) foram categorizados em dois grupos: tumores com alta MDV (n=8; 47.05%) e baixa MDV (n=9; 52.94%), os quais apresentaram níveis similares de *GPC1*, *GPC5* e *VEGFA* RNAm (Figura 12).

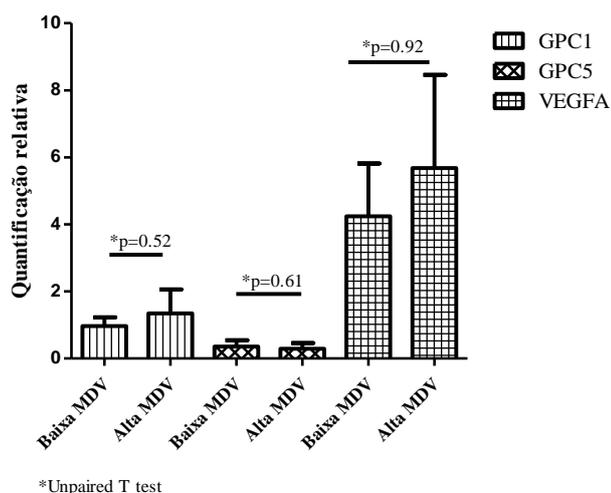


Figura 13. Níveis de expressão de *GPC1*, *GPC5* e *VEGFA* em tumores com baixa e alta MDV.

6.7 GENES HH, GPCS E POTENCIAL PROLIFERATIVO TUMORAL

A proteína MCM3 foi detectada em citoplasma e núcleo, em todos os 26 casos de CEB disponíveis para o estudo imuno-histoquímico. O número de células positivas variou de 402 a 4595, com mediana igual a 1833. Para fins de categorização dos casos

em Alto e Baixo Potencial Proliferativo (AP e BP), os CEBs que apresentaram imunomarcção no intervalo de confiança (1343 a 2204 células positivas) não foram incluídos nestes grupos. Seis CEBs (46.15%) foram agrupados como AP e 7 (53.84%) classificados como BP.

Amostras com alto potencial proliferativo apresentaram maiores níveis dos transcritos *PTCH1* ($p= 0.41$) e *SMO* ($p= 0.43$), apesar desta diferença não ter sido estatisticamente significativa (Figura 13), assim como para os genes *GPC3* ($p= 0.33$) e *GPC5* ($p= 0.93$) (Figura 14).

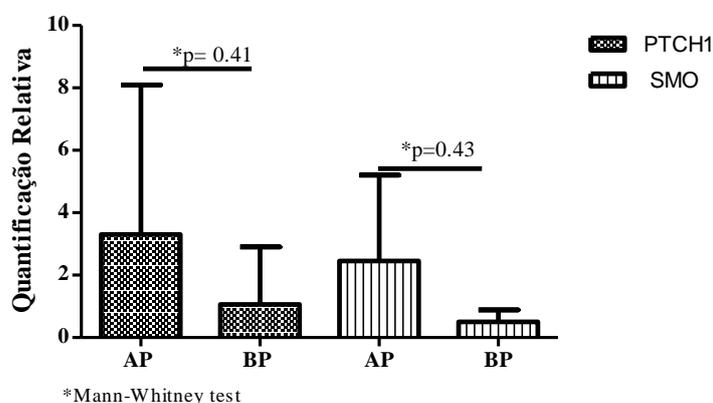


Figura 14. Expressão dos genes *PTCH1* e *SMO* em CEBs de alto e baixo perfil proliferativo.

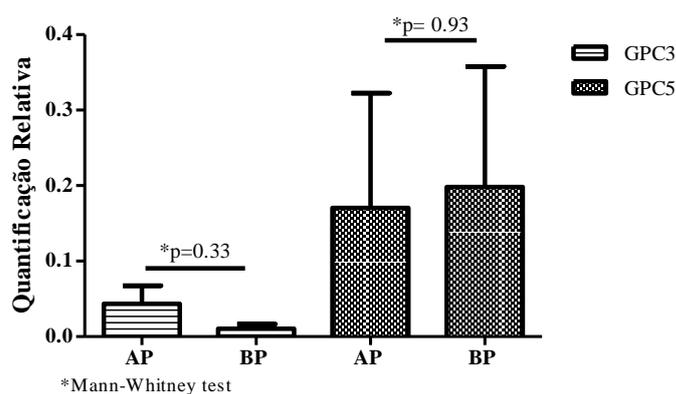


Figura 15. Expressão dos genes *GPC3* e *GPC5* em CEBs de alto e baixo perfil proliferativo.

7 DISCUSSÃO

Considerando a literatura científica disponível, este é o primeiro trabalho que avalia glicans 1, 3 e 5 em CEB. Confrontando os resultados observados para o GPC3 com conhecimento científico existente sobre esta proteína em hepatocarcinomas, sugerimos que esta proteoglicana pode despontar como um biomarcador para a progressão desta doença. Em relação ao GPC1, os resultados indicam que esta proteína pode atuar como supressora tumoral, enquanto o GPC5 pode comporta-se como uma oncoproteína em CEBs.

Sabendo-se que glicans participam da regulação das vias de sinalização HH, WNT e BMP4 (FICO; MAINA; DONO, 2011; SONG et al., 2005; TSUDA et al., 1999), bem como da interação entre células e microambiente (FILMUS; CAPURRO, 2014; HANAHAN; WEINBERG, 2011), um dos nossos objetivos também foi avaliar uma possível associação entre GPC1, 3 e 5 e moléculas da via HH (*SHH*, *SMO* e *PTCH1*), bem como o gene alvo *VEGFA*, em nível transcricional, uma vez que esta cascata sinalizadora encontra-se re-ativada em carcinomas escamocelulares de boca (CAVICCHIOLI BUIM et al., 2011; SALES, 2012; VALVERDE, 2015). Em adição, avaliamos se os níveis de glicans estavam relacionados ao potencial proliferativo tumoral (CAPURRO; FILMUS, 2005; CAPURRO et al., 2008; LI et al., 2011; WILLIAMSON et al., 2007) e angiogênese (GENGRINOVITCH et al., 1999; JAKOBSSON et al., 2006; LI et al., 2013; YANG et al., 2013).

Nesta perspectiva, inicialmente demonstramos que a via HH estava efetivamente ativada de forma aberrante nos CEBs desta casuística, através de PCR quantitativo em tempo real para os genes *SHH*, *SMO* e *PTCH1*. A superexpressão de *PTCH1* ratifica a atividade da via HH em tecidos adultos (STONE et al., 1999) e, por conseguinte, nos

tumores desta casuística. Por outro lado, transcritos do morfógeno *SHH* não foi um achado frequente, mas, quando expresso, os níveis foram elevados. Apesar de concentrações equivalentes de ligantes e receptores serem esperadas em cascatas sinalizadoras (ROGERS; SCHIER, 2011), a via HH é uma das exceções a esta evidência (CASALI; STRUHL, 2004), já que o *PTCHI* é um dos principais genes alvos dos fatores de transcrição GLI1 (HAHN et al., 1999; INCARDONA; GRUENBERG; ROELINK, 2002; STONE et al., 1999; TORROJA; GORFINKIEL; GUERRERO, 2004) e os níveis de expressão do gene que codifica este receptor são normalmente mais elevados em tecidos cuja via HH está ativada.

Além disso, moléculas que funcionam como morfógenos (ex: *SHH*) são expressas em baixas concentrações, inclusive durante o desenvolvimento embrionário (ROGERS; SCHIER, 2011) e a quantificação absoluta por métodos mais sensíveis, como o PCR digital é o mais indicado (HINDSON et al., 2013). Com relação ao *SMO*, uma maior expressão deste gene foi observada em CEBs com comprometimento de linfonodos e os níveis deste transcrito podem estar relacionados a promoção e progressão deste tumor (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012). Sendo o *SMO* um dos principais componentes associado a ativação da sinalização HH (McCabe e Leahy, 2015), esta molécula tem sido considerada um potencial alvo terapêutico, com vários trabalhos em andamento, em tumores malignos (AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013; COHEN, 2012; LOW; DE SAUVAGE, 2010), como no câncer de próstata, pâncreas carcinoma de células basais.

A correlação positiva entre *PTCHI* e *VEGFA* observada neste estudo, corrobora para a participação da via HH em outros processos que interferem no microambiente tumoral, como a angiogênese. Além disso, como ambos são alvos da via HH (POLA et al., 2001; ROGERS; SCHIER, 2011; STONE et al., 1999), ratifica a atividade aberrante

em CEB. Este resultado complementa aspectos recentemente descritos por nossa equipe (VALVERDE, 2015) que indicam que a via HH está relacionada a ativação endotelial em vasos CD105+ em CEBs e, portanto, componentes HH podem interferir em todo o contexto do microambiente tumoral (CHEN et al., 2011; HARRIS et al., 2012) e induzir a secreção de VEGFA por células mesenquimais, por exemplo (HARRIS et al., 2012; POLA et al., 2001; ROGERS; SCHIER, 2011).

Altos níveis de *VEGFA* RNAm em CEBs foram descritos em um estudo preliminar de nossa equipe (SALES, 2012)(artigo submetido), onde investigamos 56 CEBs de outro serviço de patologia. Assim como em nossos resultados anteriores, os maiores níveis de *VEGFA* foram observados em tumores T3-T4, corroborando com hipótese de que a angiogênese é importante para o crescimento de tumores malignos (FERRARA; GERBER; LECOUTER, 2003; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A ativação aberrante da via HH em CEB e as evidências de que moléculas HH participam da progressão de lesões potencialmente malignas (DIAS, 2014) e angiogênese neste tumor (SALES, 2012) respaldaram a nossa hipótese de que moléculas reguladoras da via HH também participam da patogênese do CEB da seguinte forma: o gene e proteína GPC5 está superexpressos em CEB e há uma correlação entre a expressão destes genes com os níveis de *SHH*, *PTCH1* e *SMO*. O genes e proteínas GPC1 e GPC3 são subregulados em CEB e há uma correlação inversa com os níveis dos genes *SHH*, *PTCH1* e *SMO*. Os níveis de expressão de moléculas HH e GPC1 estaria relacionado ao de VEGFA e MDV.

O GPC1 interage com o fator de crescimento VEGFA e melhora a afinidade desta molécula com seus receptores (GENGRINOVITCH et al., 1999; JAKOBSSON et al., 2006). Apesar da expressão de GPC1 ter sido consistentemente documentada em células endoteliais (MERTENS et al., 1992), nos CEBs avaliados encontramos raros

vasos positivos nas áreas representativas dos tumores. Em adição, a correlação entre *GPC1* e *VEGFA* foi fraca, em nível transcricional. Mesmo que o bloqueio de *GPC1* tenha refletido em menores níveis de *VEGFA* RNAm e angiogênese em carcinoma pancreático induzidos em camundongos (AIKAWA et al., 2008), este gene não parece participar do processo angiogênico em CEB.

Em câncer de pâncreas, o *GPC1* está normalmente superexpresso (DUAN et al., 2013; WHIPPLE; LANDER; KORC, 2008), de forma similar notamos em nível transcricional que *GPC1* estava superexpresso em CEB. No entanto em nível de proteína, notou-se uma perda de expressão de *GPC1* em CEB. Alguns estudos demonstram não existir uma correspondência entre os níveis de transcritos e de proteína final (MAIER; GÜELL; SERRANO, 2009; VOGEL; MARCOTTE, 2012) respaldam este resultado.

De fato, para *GPC1*, nossos resultados mais consistentes indicam que *GPC1* pode ser importante para a diferenciação celular. Em mucosas adjacente ao tumor e não-neoplásicas, observamos uma superexpressão de *GPC1* em membrana de células epiteliais, especialmente as do estrato espinhoso, com nítida perda de expressão nas regiões de invasão de células tumorais em direção ao estroma e, na maioria dos CEBs, poucas células parenquimais positivas. A perda de *GPC1* nas regiões de “*front*” de invasão também pode indicar que esta proteína é importante para a manutenção da polaridade tecidual.

Os estudos que envolvem *GPC1* em tumores malignos humanos são ainda muito escassos, com exceção do câncer de pâncreas, onde esta proteoglicana comporta-se como uma oncoproteína (AIKAWA et al., 2008; DUAN et al., 2013; KLEEFF et al., 1998). Outro aspecto relacionado a *GPC1* que nos chamou atenção foi a predominante imunomarcagem em células centrais das ilhas tumorais, corroborando com a nossa

sugestão de que a expressão desta molécula está relacionada a diferenciação celular, uma vez que células mais centrais de ilhas tumorais são geralmente mais diferenciadas (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O GPC1 é um co-receptor para a proteína inibidora HHIP e, alta quantidade desta proteoglicana, está relacionada a inativação da via HH (FILMUS; CAPURRO, 2014; WILSON; STOECKLI, 2013). Em tumores com a via HH ativada, há também superexpressão de *HHIP*, o qual é gene alvo dos fatores de transcrição GLI (KATOH; KATOH, 2005; OLSEN et al., 2004). Diante disso, a perda de expressão da proteína GPC1 pode contribuir para a manutenção da atividade aberrante de HH, em CEBs.

Em relação ao *GPC3*, mesmo que sem significância estatística, observamos uma correlação negativa forte com o gene *SHH*. Ao mesmo tempo, sendo regulador negativo da via HH, a presença concomitante de GPC3 e SHH em citoplasma de células tumorais indica que este proteoglicano pode estar envolvido na degradação deste morfógeno e consequente regulação da via HH em CEBs. Estes resultados corroboraram com a nossa hipótese inicial que níveis SHH e GPC3 estão inversamente relacionados (CAPURRO et al., 2008)

Níveis elevados de transcrito GPC3 estão associados a fases precoces da tumorigênese, em hepatocarcinomas (NING et al., 2012; SHIRAKAWA et al., 2009a). No entanto, em CEB notamos que o GPC3 está subregulado em nível transcricional, apesar de haver um aumento de expressão desta proteína. De forma similar, Nakatsura et al. (2004), evidenciou não haver correspondência entre os níveis de transcrito e proteína GPC3 em amostras humanas de melanoma. Após interação com o morfógeno, GPC3 será internalizado para degradação e regulação de ligantes, no entanto o GPC pode ser reciclado e retornar a membrana plasmática para exercer sua função

(CHRISTIANSON, BELTING, 2014), o que pode explicar os altos níveis de proteínas, mesmo sendo observado que o gene GPC3 está subregulado.

A análise qualitativa de GPC3 em CEB, MAT e MNN demonstrou que esta proteína é encontrada em tecido tumoral, mas não na contraparte não neoplásica do tecido. Este aspecto também é evidenciado nos estudos envolvendo hepatocarcinomas e melanomas (LU et al., 2001; CAPURRO et al., 2003; KIM et al., 2003; NAKATSURA et al., 2004; AVIEL-RONEN et al., 2008). A proteína GPC3 foi identificada em membrana e citoplasma de células do parênquima tumoral, especialmente em células localizadas na periferia das ilhas tumorais. Outro aspecto que chamou atenção foi a predominância de marcação citoplasmática no “*front*” de invasão tumoral. Em adição, as investigações direcionadas ao GPC3 em CEB são importantes para avaliar se, neste tipo tumoral, esta molécula poderá ser utilizada como marcador diagnóstico e de prognóstico, como no hepatocarcinoma (CAPURRO; FILMUS, 2005; SHIRAKAWA et al., 2009a, 2009b), ou até mesmo como alvo terapêutico (KOMORI et al., 2006).

A participação do GPC5 em neoplasias malignas humanas ainda é pouco compreendida. A superexpressão de GPC5 (gene e proteína) em CEB, enquanto que na contraparte normal não foi detectado a presença deste GPC, sugerem que esta molécula pode estar participando como uma oncoproteína em CEB, e atua em parênquima e estroma. Corroborando com esta hipótese, em tecidos adultos, níveis significantes do transcrito *GPC5* só foram descritos em testículo e cérebro, enquanto fígado, pulmões e rins apresentaram níveis baixos e, por último, nenhuma expressão foi detectada em pele e mama (THWAY; SELFE; SHIPLEY, 2012).

A co-localização em citoplasma das proteínas SHH e GPC5 indicam que esta proteoglicana pode estar sendo endocitada com o PTCH1 (INCARDONA; GRUENBERG; ROELINK, 2002), suscitando estudos que investiguem os mecanismos

de internalização dos sinais HH neste tipo tumoral. Cabe salientar que a localização de GPC5 na mesma estrutura celular onde a via HH funciona (*cilium* primário) facilita a interação com PTCH1 e a afinidade com SHH (LI et al., 2011). A correlação positiva forte observada nos níveis de transcritos PTCH1 e GPC5, assim como a co-localização das proteínas GLI1 e GPC5, corroboram com a hipótese que o GPC5 está contribuindo para a ativação da via HH em CEB. Um achado importante neste trabalho foi a presença de células endoteliais positivas para GPC5, sendo que não encontramos uma correlação forte com os níveis de VEGFA RNAm. Apenas um trabalho na literatura científica avaliou a relação entre *GPC5* e *VEGFA*, não sendo constatada nenhuma alteração nos níveis de expressão de *VEGFA* em células de adenocarcinoma de pulmão, quando *GPC5* foi silenciado e/ou estimulado (YANG et al., 2013). Em trabalho recente de nosso grupo, células endoteliais de vasos CD105+ foram positivas para GLI1 (VALVERDE, 2015) e a co-localização das proteínas GLI1 e GPC5 em vasos sanguíneos sugerem que esta proteoglicana contribui para ativação da via HH em vasos associados ao tumor.

Em adição, células estromais, como fibroblastos exibiram imunomarcção em citoplasma frequente em CEBs. Apesar deste aspecto ainda não estar descrito na literatura, os estudos mais consistentes sobre GPC5 são em rhabdomyosarcomas e, nestes tumores, há uma superexpressão desta proteína (LI et al., 2011; WILLIAMSON et al., 2007), indicando que GPC5 pode desempenhar um papel importante em células mesenquimais do microambiente tumoral.

Para avaliar o perfil proliferativo do CEB, neste estudo, caracterizamos a imunomarcção da proteína MCM3. Esta é uma helicase fundamental na replicação do DNA eucariótico (LEE et al., 2010; LAMEIRA et al., 2014) e que não se encontra expressa em células diferenciadas ou quiescentes (ENDL et al., 2001). O uso deste

marcador em CEB foi caracterizado pela primeira vez em um estudo da nossa equipe (VALVERDE, 2015), no qual demonstramos uma maior expressão de MCM3 em CEBs com menor grau de diferenciação. Não encontramos relação entre a expressão de genes GPC e potencial proliferativo tumoral, assim como a maioria dos parâmetros clínicos avaliados. Em relação ao tamanho desta casuística, optamos por um método de análise mais robusto, excluindo casos de CEBs cuja expressão de MCM3 coincidia com o intervalo de confiança.

Em adição, um aspecto importante que pode ter contribuído para os níveis de QR observados para GPCs, genes HH e VEGFA neste trabalho, foi a utilização de margens adjacentes aos tumores como amostra calibradora. Apesar desta estratégia ser a mais adotada em diversos estudos (HUANG et al., 2006; LEOVIC et al., 2012), o conceito de margem molecular de tumores - “*field cancerization*”- (PEREZ-ORDOÑEZ; BEAUCHEMIN; JORDAN, 2006) tem sido cada vez mais aceito na pesquisa em câncer.

Por fim, os resultados encontrados neste trabalho, indicam que estas proteoglicanas participam da patogenia do carcinoma escamocelular bucal, entretanto os eventos biológicos controlados/regulados por estes glipicans ainda devem ser objeto de investigações. Em adição, como o GPC3 é passível de detecção em sangue periférico, estudos que avaliem a presença desta proteína em coortes de pacientes acometidos pela doença poderão indicar se esta proteína é um candidato a biomarcador em CEB.

8 CONCLUSÕES

- Transcritos dos genes *GPC1*, 3 e 5 são encontrados em CEB, sendo que os níveis de *GPC3* e *GPC5* são maiores que *GPC1*. A correlação entre os transcritos *GPC5* e *PTCH1*, bem como a superexpressão das proteínas GPC5 e GPC3 e perda de imunopositividade de GPC1 são consistentes com a participação destes proteoglicanos como reguladores da via HH em CEB.

- O padrão de expressão de GPC1 sugere que esta proteína pode participar da biologia tumoral como uma proteína supressora tumoral, enquanto GPC3 e GPC5 comportam-se como oncoproteínas. A presença de GPC5 em estroma tumoral (células endoteliais e fibroblastos) também pode estar associada a regulação da via HH neste compartimento do microambiente tumoral.

- Não houve evidências de que tumores com parâmetros clínicos e morfológicos de agressividade, com maior potencial proliferativo e microdensidade vascular possuem maiores níveis de genes glipicans e Hedgehog, ao mesmo tempo que GPC1, em CEB, parece não contribuir para a angiogênese tumoral. Em adição, a correlação entre os níveis de *PTCH1* e *VEGFA* indicam que a via HH está associada ao processo de angiogênese tumoral.

REFERÊNCIAS

AIKAWA, T. et al. Glypican-1 modulates the angiogenic and metastatic potential of human and mouse cancer cells. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 1, p.89-99, 2008.

AMAKYE, D.; JAGANI, Z.; DORSCH, M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Medicine*, v. 19, n. 11, p. 1410–1422, 2013.

ASAI, J. et al. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation*, v. 113, n. 20, p. 2413–2424, 2006.

AVIEL-RONEN, S. et al. Glypican-3 is overexpressed in lung squamous cell carcinoma, but not in adenocarcinoma. *Modern Pathology*, v. 21, n. 7, p. 817–825, 2008.

BAEG, G. H. et al. Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development*, v. 128, p. 87–94, 2001.

BERGERS, G.; BENJAMIN, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 6, p. 401–410, 2003.

BERMAN, D. M. et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*, v. 425, p. 846–851, 2003.

BHARGAVA, A.; SAIGAL, S.; CHALISHAZAR, M. Histopathological grading systems in oral squamous cell carcinoma : A review, 2010. p. 1–10.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acesso em: 05 de fev. 2014.

CALIFANO, J. et al. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer : Implications for Field Cancerization . *Cancer Research*, n. 1, p. 2488–2492, 1996.

CANO-GAUCI, D. F. et al. Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. **Journal of Cell Biology**, v. 146, p. 255–264, 1999.

CAPURRO, M. et al. Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 125, n. 1, p. 89–97, 2003.

CAPURRO, M.; FILMUS, J. **Glypican-3 as a serum marker for hepatocellular carcinoma letters to the editor**. 2005. p. 372–373.

CAPURRO, M. I. et al. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. **Developmental Cell**, v. 14, n. 5, p. 700–11, 2008.

CAPURRO, M. I.; LI, F.; FILMUS, J. Overgrowth of a mouse model of Simpson-Golabi-Behmel syndrome is partly mediated by Indian hedgehog. **EMBO Reports**, v. 10, p. 901–907, 2009.

CAPURRO, M. I.; SHI, W.; FILMUS, J. LRP1 mediates Hedgehog-induced endocytosis of the GPC3-Hedgehog complex. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 14, p. 3380–3389, 2012.

CASALI, A.; STRUHL, G. Reading the Hedgehog morphogen gradient by measuring the ratio of bound to unbound Patched protein. **Nature**, v. 431, p. 76–80, 2004.

CAVICCHIOLI BUIM, M. E. et al. Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **Human Pathology**, v. 42, n. 10, p. 1484–1490, 2011.

CHARI, N. S.; MCDONNELL, T. J. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. **Advances in anatomic pathology**, v. 14, n. 5, p. 344–352, 2007.

CHEN, W. et al. Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 23, p. 9589–9594, 2011.

CHEN, X. et al. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis. **Cancer Science**, v. 98, n. 1, p. 68–76, 2007.

CHRISTIANSON, H.C.; BELTING, M. Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. **Matrix Biology**, v.35, p. 51-55, 2014.

CLATOT, F. et al. The gene expression profile of inflammatory, hypoxic and metabolic genes predicts the metastatic spread of human head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 50, n. 3, p. 200–207, 2014.

COHEN, D. J. Targeting the hedgehog pathway: role in cancer and clinical implications of its inhibition. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 565–588, 2012.

CONI, S.; INFANTE, P.; GULINO, A. Control of stem cells and cancer stem cells by Hedgehog signaling: pharmacologic clues from pathway dissection. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 5, p. 623–628, 2013.

DIAS, R.B. **Estudo do perfil de expressão de componentes da via de sinalização sonic hedgehog em displasia epitelial oral**. 2014. 71 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

DING, K. et al. Growth factor-induced shedding of syndecan-1 confers glypican-1 dependence on mitogenic responses of cancer cells. **Journal of Cell Biology**, v. 171, p. 729–738, 2005.

DUAN, L. et al. GPC-1 may serve as a predictor of perineural invasion and a prognosticator of survival in pancreatic cancer. **Asian Journal of Surgery - Asian Surgical Association**, v. 36, n. 1, p. 7–12, 2013.

ENDL, E. et al. The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells. **The Journal of Pathology**, v. 195, n. 4, p. 457–62, nov. 2001.

FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 669–76, jun. 2003.

FICO, A; MAINA, F.; DONO, R. Fine-tuning of cell signaling by glypicans. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 6, p. 923–929, 2011.

FILMUS, J. Glypicans in growth control and cancer. **Glycobiology**, v. 11, n. 3, p. 19R–23R, 2001.

FILMUS, J.; CAPURRO, M. The role of glypican-3 in the regulation of body size and cancer. **Cell Cycle**, v. 7, n.18, p. 2787–2790, 2008.

FILMUS, J.; CAPURRO, M. The role of glypicans in Hedgehog signaling. **Matrix biology - journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 35, p. 248–252, 2014.

FILMUS, J.; CAPURRO, M.; RAST, J. Glypicans. **Genome Biology**, v. 9, n. 5, p. 224–224.6, 2008.

FILMUS, J.; SELLECK, S. B. Glypicans : proteoglycans with a surprise. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 4, p. 497–501, 2001.

FOULDS, L. HORMONES AND CANCER. **The Practitioner**, v. 192, p. 370–375, 1964.

GARCÍA-SUÁREZ, O. et al. Neuroendocrine tumors show altered expression of chondroitin sulfate, glypican 1, glypican 5, and syndecan 2 depending on their differentiation grade. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 1-15, 2014.

GENGRINOVITCH, S. et al. Glypican-1 Is a VEGF 165 Binding Proteoglycan That Acts as an Extracellular Chaperone for VEGF 165. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10816–10822, 1999.

GOLD, K. A.; LEE, H.-Y.; KIM, E. S. Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer**, v. 115, p. 922–935, 2009.

GOODRICH, L. V et al. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. **Genes & Development**, v. 10, n. 3, p. 301–312, 1996.

GOODRICH, L. V. Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse patched Mutants. **Science**, v. 277, n. 5329, p. 1109–1113, 1997.

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

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

HÄCKER, U.; NYBAKKEN, K.; PERRIMON, N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. **Nature reviews- Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 7, p. 530–541, 2005.

HAHN, H. et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Cell**, v. 85, n. 6, p. 841–51, 1996.

HAHN, H. et al. The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models. **Journal of Molecular Medicine**, v. 77, n. 6, p. 459–68, 1999.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.

HARDCASTLE, Z.; HUI, C. C.; SHARPE, P. T. The Shh signalling pathway in early tooth development. **Cellular and Molecular Biology**, v. 45, p. 567–578, 1999.

HARRIS, L. G. et al. Increased vascularity and spontaneous metastasis of breast cancer by hedgehog signaling mediated upregulation of *cyr61*. **Oncogene**, v. 31, p. 3370–3380, 2012.

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

HERRERO, R. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. **Cancer Spectrum Knowledge Environment**, v. 95, n. 23, p. 1772–1783, 2003.

HINDSON, C. M. et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. **Nature Methods**, v. 10, p. 1003–1005, 2013.

HIPPO, Y. Identification of Soluble NH₂-Terminal Fragment of Glypican-3 as a Serological Marker for Early-Stage Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Research**, v. 64, n. 7, p. 2418–2423, 2004.

HISHINUMA, M. et al. Hepatocellular oncofetal protein, glypican 3 is a sensitive marker for alpha-fetoprotein-producing gastric carcinoma. **Histopathology**, v. 49, n. 5, p. 479–86, 2006.

HONAMI, T. et al. Sonic hedgehog signaling promotes growth of oral squamous cell carcinoma cells associated with bone destruction. **Oral Oncology**, v. 48, n. 1, p. 49–55, 2012.

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

HUANG, S. et al. Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 7, p. 1334–40, 2006.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, v. 6, n. 4, p. 279–84, 2005.

HUNTER, K. D.; PARKINSON, E. K.; HARRISON, P. R. Profiling early head and neck cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 2, p. 127–35, 2005.

INCARDONA, J. P.; GRUENBERG, J.; ROELINK, H. Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothed in endosomes. **Current Biology**, v. 12, p. 983–995, 2002.

INGHAM, P. W.; MCMAHON, A. P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes & Development**, v. 15, n. 23, p. 3059–87, 2001.

JAKOBSSON, L. et al. Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. **Developmental Cell**, v. 10, n. 5, p. 625–34, 2006.

JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

JOHNSON, N. et al. Squamous cell carcinoma. In: **World Health Organization classification of tumors. Pathology & Genetics. Head and neck tumours.** International Agency for Research on Cancer (IARC) IARC Press 2005. p. 168-175

KANDIL, D. et al. Glypican-3 protein expression in primary and metastatic melanoma: a combined immunohistochemistry and immunocytochemistry study. **Cancer**, v. 117, n. 4, p. 271–8, 2009.

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

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

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

KIM, H. et al. The heparan sulfate proteoglycan GPC3 is a potential lung tumor suppressor. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 29, n. 6, p. 694–701, 2003.

KLEEFF, J. et al. The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, p. 1662–1673, 1998.

KOMORI, H. et al. Possibilities of glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma. **Cancer & Chemotherapy**, v. 33, p. 1742–1744, 2006a.

KOMORI, H. et al. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 2689–2697, 2006b.

LAMBERT, R. et al. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. **European Journal Of Gastroenterology & Hepatology**, v. 23, n. 8, p. 633–641, 2011.

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

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

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

LI, F. et al. Glypican-5 stimulates rhabdomyosarcoma cell proliferation by activating Hedgehog signaling. **The Journal of Cell Biology**, v. 192, n. 4, p. 691–704, 2011.

LI, Y. et al. The overexpression of glypican-5 promotes cancer cell migration and is associated with shorter overall survival in non-small cell lung cancer. **Oncology Letters**, v. 6, n. 6, p. 1565–1572, 2013.

LIN, H. et al. Advances in Brief Frequent Silencing of the GPC3 Gene in Ovarian Cancer Cell Lines. **Cancer Research**, v. 59, n. 4, p. 807–810, 1999.

LIN, X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. **Development**, v. 131, p. 6009–6021, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOW, J. A; DE SAUVAGE, F. J. Clinical experience with Hedgehog pathway inhibitors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 36, p. 5321–5326, 20 dez. 2010.

LU, J. et al. Gene expression profile changes in initiation and progression of squamous cell carcinoma of esophagus. **International Journal of Cancer. Journal International du Cancer**, v. 91, n. 3, p. 288–294, 2001.

MAIER, T.; GÜELL, M.; SERRANO, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS Letters**, v. 583, n. 24, p. 3966–3973, 2009.

MARIONI, G. et al. CD105 is a marker of tumour vasculature and a potential target for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 5, p. 361–367, maio 2010.

MATSUDA, K. et al. Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 61, p. 5562–5569, 2001.

MCMILLAN, R.; MATSUI, W. Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**, v.18, n. 18, p. 4883–8, 2012.

MÉNDEZ, E. et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. **Cancer**, v. 95, n.7, p. 1482–1494, 2002.

MERTENS, G. et al. Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, p. 20435–20443, 1992.

MUKHERJEE, S. et al. Hedgehog signaling and response to cyclopamine differ in epithelial and stromal cells in benign breast and breast cancer. **Cancer Biology Therapeutics**, v. 5, p. 674–683, 2006.

MURTHY, S. S. et al. Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma. **Oncogene**, v.19, p. 410–416, 2000.

NAKATSURA, T. et al. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. **Clinical Cancer Research**, v.10, n. 19, p. 6612–21, 2004.

NERI, G. et al. **Clinical and molecular aspects of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. American Journal of Medical Genetics**, v.70, n. 4, p.279-283, 1998.

NING, S. et al. Glypican-3, a novel prognostic marker of hepatocellular cancer, is related with postoperative metastasis and recurrence in hepatocellular cancer patients. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 1, p. 351–357, 2012.

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

PAINE-SAUNDERS, S.; VIVIANO, B. L.; SAUNDERS, S. GPC6, a novel member of the glypican gene family, encodes a product structurally related to GPC4 and is colocalized with GPC5 on human chromosome 13. **Genomics**, v.57, p. 455–458, 1999.

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

PEREZ-ORDOÑEZ, B.; BEAUCHEMIN, M.; JORDAN, R. C. K. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Journal of Clinical Pathology**, v.59, n. 5, p. 445–453, 2006.

PILIA, G. et al. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. **Nature Genetics**, v.12, p. 241–247, 1996.

POLA, R. et al. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. **Nature Medicine**, v. 7, n. 6, p. 706–711, 2001.

RIOBO, N. A.; HAINES, G. M.; EMERSON, C. P. Protein kinase C-delta and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-1 control GLI activation in hedgehog signaling. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 839–845, 2006.

RODRIGUES, P. C. et al. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 7, p. 795–801, 2014.

ROGERS, K. W.; SCHIER, A. F. Morphogen gradients: from generation to interpretation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, p. 377–407, 2011.

ROSENBERG RD, SHWORAK NW, LIU J, SCHWARTZ JJ, Z. L. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11 Suppl, p. S–67–75, 1997.

RUAN, M. et al. Evaluation of expression of midkine in oral squamous cell carcinoma and its correlation with tumour angiogenesis. **International Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery**, v. 36, n. 2, p. 159–64, 2007.

RUIZ I ALTABA, A.; SÁNCHEZ, P.; DAHMANE, N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 361–372, 2002.

SALES, C. B. S. **Expressão de componentes da via de sinalização sonic hedgehog (HHIP, PTCH1 e SHH) e VEGF-A em carcinoma escamocelular: associação com imunomarcção de VEGF-A e microdensidade vascular**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

SANCHEZ, P.; CLEMENT, V.; RUIZ I ALTABA, A. Therapeutic targeting of the Hedgehog-GLI pathway in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 8, p. 2290–2292, 2005.

SANDBLUND, J. et al. Endoglin (CD105) expression in human renal cell carcinoma. **BJU International**, v. 97, n. 4, p. 706–710, 2006.

SHIRAKAWA, H. et al. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for a component of hepatocellular carcinoma in human liver cancer. **International Journal of Oncology**, v. 4, n.3, p. 649–656, 2009a.

SHIRAKAWA, H. et al. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Cancer Science**, v. 100, n. 8, p. 1403–1407, 2009b.

SICA, A. et al. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 6, 717-727, 2006.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 5, p. 349–55, 2008.

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

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11–30, 2013.

SOBIN, L.; WITTEKIND, C. (EDS.). **TNM Classification of Malignant Tumours**. 6. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, INC., 2002.

SONG, H. H. et al. The loss of glypican-3 induces alterations in Wnt signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 2116–2125, 2005.

STECCA, B.; RUIZ I ALTABA, A. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 84-95, 2010.

STEINFELD, R.; VAN DEN BERGHE, H.; DAVID, G. Stimulation of fibroblast growth factor receptor-1 occupancy and signaling by cell surface-associated syndecans and glypican. **Journal of Cell Biology**, v. 133, p. 405–416, 1996.

STONE, D. M. et al. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 2, p. 4437–4448, 1999.

THAYER, S. P. et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 851–856, 2003.

THWAY, K.; SELFE, J.; SHIPLEY, J. Immunohistochemical detection of glypican-5 in paraffin-embedded material: an optimized method for a novel research antibody. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 20, n. 2, p. 189–195, 2012.

TORROJA, C.; GORFINKIEL, N.; GUERRERO, I. Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. **Development**, v. 131, n. 10, p. 2395–2408, 2004.

TSUDA, M. et al. The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingless signalling in *Drosophila*. **Nature**, v. 400, p. 276–280, 1999.

VALVERDE, L. DE F. **Via Hedgehog em Carcinoma Escamocelular de Boca: associação com macrófagos alternativamente ativados, angiogênese, proliferação celular e diferenciação celular**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n.7, p.34, 2002.

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

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews. Genetics**, v. 13, n. 4, p. 227–232, 2012.

WATKINS, D. N. et al. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. **Nature**, v. 422, n. 6929, p. 313–317, 2003.

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

WHIPPLE, C. A.; LANDER, A. D.; KORC, M. Discovery of a novel molecule that regulates tumor growth and metastasis. **The Scientific World Journal**, v. 8, p. 1250–1253, 2008.

WICKI, A.; CHRISTOFORI, G. The angiogenic switch in tumorigenesis. In: **Tumor Angiogenesis- Basic Mechanisms and Cancer Therapy**. [s.l]. p. 67–88.

WILLIAMSON, D. et al. Role for amplification and expression of glypican-5 in rhabdomyosarcoma. **Cancer Research**, v. 67, n. 1, p. 57–65, 2007.

WILSON, N. H.; STOECKLI, E. T. Sonic hedgehog regulates its own receptor on postcrossing commissural axons in a glypican1-dependent manner. **Neuron**, v. 79, n. 3, p. 478–491, 2013.

WITT, R. M. et al. Heparan sulfate proteoglycans containing a glypican 5 core and 2-O-sulfo-iduronic acid function as sonic hedgehog co-receptors to promote proliferation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 26275–26288, 2013.

XIANG, Y. Y.; LADEDA, V.; FILMUS, J. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. **Oncogene**, v. 20, n. 50, p. 7408–7412, 2001.

YAN, B. et al. Expression and clinicopathologic significance of glypican 3 in hepatocellular carcinoma. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 15, n. 3, p. 162–169, 2011a.

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

YANG, X. et al. Glypican-5 is a novel metastasis suppressor gene in non-small cell lung cancer. **Cancer Letters**, v. 341, n. 2, p. 265–273, 2013.

YANG, Y. et al. Expression and regulation of hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 395, n. 5, p. 515–525, 2010.

ZITTERMANN, S. I. et al. Soluble glypican 3 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 1291–1301, 2010.